

Aus der Klinik für kleine Haustiere  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

und

aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie  
der Universität Rostock

**Diabetes mellitus führt zur Akkumulation von dendritischen Zellen und zur Zerstörung  
des subbasalen Nervenplexus der Cornea in der Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Katja Leppin

Tierärztin

aus Kyritz

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3741

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. J. C. Eule  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. S. Amasheh

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

dendritic cells; diabetes mellitus; cornea; nerve fibers; mice; confocal  
microscopy

Tag der Promotion: 09.07.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-622-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Meiner Familie



# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURÜBERSICHT .....	2
2.1	Diabetes mellitus Typ I und Typ II .....	2
2.2	Hauptsymptomatiken des Diabetes mellitus .....	3
2.2.1	Die diagnostische Erfassung der diabetischen Polyneuropathie .....	7
2.3	Die Cornea – Anatomie und Physiologie .....	9
2.3.1	Die Cornea – ein hoch spezialisiertes Gewebe .....	16
2.4	Das Auge – ein immunprivilegiertes Organ .....	17
2.4.1	Antigen-präsentierende Zellen .....	19
2.4.1.1	Dendritische Zellen in der Cornea .....	21
3	ZIELSTELLUNG .....	22
4	MATERIAL UND METHODEN .....	23
4.1	Versuchstiere .....	23
4.2	Tiermodell .....	23
4.2.1	Modell des STZ-induzierten DM .....	23
4.2.2	Modell der B6.VLep <sup>ob/ob</sup> -Maus .....	24
4.2.3	Induktion des DM I / II und dessen Überprüfung .....	25
4.3	<i>In vivo</i> konfokale Mikroskopie .....	25
4.3.1	Grundlagen der <i>in vivo</i> konfokalen Mikroskopie .....	25
4.3.2	Anästhesie der Versuchstiere .....	28
4.3.3	Analyse muriner Corneas .....	28
4.3.4	Off-Line Auswertung .....	31
4.4	Immunhistochemie (IHC) der Cornea .....	33
4.4.1	Gewebeprobenentnahme und Anfertigung von corneal whole mounts .....	33
4.4.2	Eingesetzte Antikörper zur Zelldiskriminierung .....	34
4.4.3	Analyse der corneal whole mounts mittels <i>in vitro</i> konfokaler Mikroskopie .....	35
4.5	Statistik .....	36
5	ERGEBNISSE .....	37
5.1	Zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration und des Körpergewichts der Versuchstiere .....	37
5.2	<i>In vivo</i> konfokale Mikroskopie der Cornea (CCM) .....	38
5.2.1	<i>In vivo</i> CCM von Mäusen mit STZ-induziertem Diabetes mellitus .....	38
5.2.2	<i>In vivo</i> CCM Analyse von ob/ob-diabetischen Mäusen .....	40
5.3	<i>In vitro</i> konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts .....	42
5.3.1	Corneal whole mounts von STZ-induzierten und ob/ob-diabetischen Mäusen .....	43

6	DISKUSSION.....	51
6.1	Diskussion von Material und Methoden .....	51
6.1.1	Diskussion der Tiermodelle.....	51
6.1.2	Diskussion der <i>in vivo</i> CCM .....	53
6.1.3	Diskussion der Off-Line Auswertung .....	54
6.1.4	Diskussion der <i>in vitro</i> konfokalen Mikroskopie.....	58
6.2	Diskussion der Ergebnisse.....	59
6.2.1	Die Nervenfasern des SNP in der diabetischen Cornea .....	60
6.2.2	DCs in der diabetischen Cornea .....	62
6.2.3	Assoziation zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und Nervenfasern.....	65
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
8	SUMMARY.....	69
9	REFERENZEN.....	71
10	PUBLIKATIONSLISTE.....	85
11	DANKSAGUNG .....	86
12	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	87

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACAID	Anterior Chamber-Associated Immune Deviation
AGEs	Advanced Glycation End Products
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BG	Blutglukose
BM	Bowman Membran
BSA	Bovines Serumalbumin
CCM	Corneal Confocal Microscopy
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zelle
DCD	Dendritische Zelldichte
DM	Diabetes mellitus
DM I	Diabetes mellitus Typ I
DM II	Diabetes mellitus Typ II
DPN	Diabetische sensorimotorische Polyneuropathie
eGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
GLUT2	Glukosetransporter 2
HRT II	Heidelberg Retina Tomograph II
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
KGW	Körpergewicht
LC	Langerhans Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNT	Membrane Nanotube
NaCl	Natriumcitrat
NFD	Nervenfaserdichte
NFT	Nervenfasertortuosität

NOD	Non-Obese Diabetic
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
QST	Quantitative sensorische Testung
RCM	Rostock Cornea Module
RT	Raumtemperatur
SNP	Subbasaler Nervenplexus
STZ	Streptozotocin

## 1 EINLEITUNG

Diabetes mellitus (DM) ist eine Stoffwechselerkrankung, die auch als Wohlstandserkrankung verstanden wird und klassischerweise mit einer Erhöhung des Blutglukose (BG)-Spiegels verbunden ist. Die Begründung findet sich neben einer genetischen Vorbelastung u. a. auch in der guten aber auch unausgewogenen Ernährung des Menschen wieder, die als Folge eine Imbalance des Energiehaushaltes nach sich ziehen kann. Dieses Ungleichgewicht spiegelt sich in der „Fehlfunktion“ vieler Organe und Gewebe, wie beispielsweise dem Nervensystem, wieder. Die periphere Polyneuropathie spielt dabei eine entscheidende Rolle. Sie ist anfänglich schwer zu diagnostizieren und führt daher ohne rechtzeitige Therapie zu einem schnelleren Voranschreiten der Symptomatik.

Bei der Diagnostik der peripheren Polyneuropathie steht damit nicht nur das alleinige Erkennen der Nervendegeneration im Vordergrund, sondern vielmehr noch deren frühzeitige Feststellung. Neben vielerlei Methoden wie die quantitative sensorische Testung, die Biopsie des Nervus suralis und dem aktuellen Goldstandard der Haubiopsie, bringen diese diagnostischen Mittel hinsichtlich ihrer Effektivität und Invasivität für den Patienten einige Nachteile mit sich. Dem gegenüber steht die nicht-invasive *in vivo* konfokale Mikroskopie, die, u. a. durch die Betrachtung der Cornea, eine zuverlässige Aussage hinsichtlich neuronaler Veränderungen treffen und diese auch im frühen Stadium detektieren kann. Die hochauflösenden Eigenschaften des Mikroskops ermöglichen zusätzlich auch die Darstellung anderer zellulärer Strukturen der Cornea, wie beispielsweise Zellen des Immunsystems.

Da die Erhöhung des BG-Spiegels zusätzlich auch mit einer gewissen inflammatorischen Komponente einhergeht, und hierbei eine Rekrutierung von immunologischen Zellen bekannt ist, soll im Rahmen dieser Arbeit die *in vivo* konfokale Mikroskopie der Cornea im diabetischen Mausmodell angewendet werden, um einen möglichen Zusammenhang des nervalen und immunologischen Systems zu evaluieren.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Diabetes mellitus Typ I und Typ II

Die Erkrankung des DM stellt eine veränderte metabolische Stoffwechsellage des Organismus dar, die einem erhöhten BG-Spiegel auf Grund einer defekten Insulinproduktion, -funktion oder beidem zugrunde liegt (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Während das Jahr 2013 eine Anzahl von 382 Millionen diabetischer Menschen verzeichnete, werden es im Jahr 2035 voraussichtlich 592 Millionen sein (International Diabetes Federation, 2004). Durch das im Blut unterschiedliche Vorhandensein von Nährstoffen schwankt die BG-Konzentration über den Tagesverlauf hinweg. Die BG wird jedoch durch eine angepasste Sekretion der pankreatischen Hormone Glucagon und vor allem Insulin auf einem relativ konstanten Wert gehalten. Bei einem Anstieg des BG-Spiegels, erhöht sich der Blutfluss des Pankreas (Jansson and Hellerstrom, 1986) mit einer darauf folgenden Freisetzung des in den  $\beta$ -Zellen produzierten Insulins. Die Ausschüttung des anabolen Hormons ermöglicht es, Glukose in Muskel- und Fettgewebe in Form von Glykogen bzw. Triglyceriden zu speichern und damit den Gehalt an BG zu senken. In der Leber bewirkt Insulin die Hemmung der Glukoneogenese und die Aktivierung der Glykogenolyse (Kahn & Pessin, 2002). Hinsichtlich der Entstehung des erhöhten BG-Spiegels und dem damit einhergehenden gestörten Metabolismus von Carbohydraten, Fettsäuren und Proteinen, wird der DM in unterschiedliche Typen eingeteilt, jedoch hauptsächlich in einen Typ I (DM I) und Typ II (DM II). Vom DM I sind derzeit ca. 5 - 10 % der an DM erkrankten Menschen betroffen (Rorsman and Braun, 2013). Diese Form entsteht aus einem autoimmunen Prozesses heraus, innerhalb dessen es zu einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und zum absoluten Insulinmangel kommt (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Eine gezielte Untersuchung von spezifischen, gegen die pankreatischen Inselzellen gerichteten Autoantikörpern lässt zunächst die initiale Differenzierung zwischen Typ I und II zu. Erfolgt ein positiver Nachweis dieser Autoantikörper bei diabetischen Patienten, liegt ein DM Typ I a vor (Winter et al., 2002). Hingegen dazu wird der Typ I b einer idiopathischen Genese zugeordnet, da kein

Hinweis auf einen autoimmunen Prozess in Form von Autoantikörpern vorliegt (Imagawa et al., 2000). Der DM II, von dem über 90 % der an DM erkrankten Bevölkerung betroffen sind (Rorsman & Braun, 2013), ist durch eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel charakterisiert (DeFronzo et al., 1992). Betroffene Patienten mit diesem komplexen Krankheitsbild sind zumeist übergewichtig. Eine Erhöhung von freien Fettsäuren im Blutplasma führt zu der Bildung von Lipidmetaboliten wie beispielsweise Diacylglycerol und kann eine Insulinresistenz in den peripheren Organ- und Gewebestrukturen hervorgerufen (Boden, 2011). Um dem Zustand der peripheren Insulinresistenz entgegenzuwirken, reagieren die  $\beta$ -Zellen mit einer vermehrten Ausschüttung von Insulin (Kahn, 2001). Es ist jedoch nicht möglich, diese Überproduktion unbegrenzt aufrecht zu erhalten bzw. ausreichend Insulin zu sezernieren, um den physiologischen BG-Spiegel aufrecht zu erhalten (Bell & Polonsky, 2001).

Von DM betroffene Menschen benötigen hinsichtlich ihrer Erkrankung ein striktes Management, um mit ihrer veränderten Lebenssituation entsprechend umzugehen zu können und der Entstehung von Langzeitkomplikationen entgegenzuwirken. Dies kann bei vielen Patienten zu einer verminderten Lebensqualität führen, besonders im Hinblick auf physische Funktionen und dem damit verbundenen allgemeinen Wohlbefinden (Rubin & Peyrot, 1999). Peyrot et al. konnten sogar eine signifikante Zunahme klinischer Symptome hinsichtlich depressiver Zustände und Angst auf Grund des Vorhandenseins einer oder mehrerer Komplikationen diabetischer Patienten demonstrieren (Peyrot & Rubin, 1997).

## **2.2 Hauptsymptomatiken des Diabetes mellitus**

Die beim DM vorliegende Insulinresistenz bzw. die Insuffizienz, Insulin zu sezernieren, führt zu einer Erhöhung der BG. Dies resultiert in einer Vielzahl an unterschiedlichen und komplizierten Symptomen, die sich in verschiedenen pathologischen Veränderungen von Organen bzw. Organsystemen äußern. DM ist ein starker Risikofaktor, der zur Erhöhung der Mortalitätsrate bei kardiovaskulären Erkrankungen führt (Stamler et al., 1993). Des Weiteren

liegt bei diabetischen Patienten eine gestörte Funktion des Gefäßendothels vor (Tooke & Goh, 1999). Die Formation von sogenannten Advanced Glycationen End Products (AGEs) und deren Interaktion mit einzelnen Bestandteilen der Gefäßwand führt zu einer gesteigerten Permeabilität des Endothels und zur erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (Basta et al., 2004). Die gesteigerte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 und des vaskulären Adhäsionsmoleküls 1 reflektieren weiterhin eine endotheliale Dysfunktion (Wen et al., 2002), die zu mikrovaskulären Komplikationen führt. Im Zusammenhang damit steht die diabetische Nephropathie, gekennzeichnet durch morphologische Veränderungen auf zellulärer Ebene, die auf Grund vaskulärer Veränderungen zu einer verminderten glomerulären Filtrationsrate und daraus folgend zu einer Proteinurie führen (Jefferson et al., 2008). Sowohl Proteinurie als auch Mikroalbuminurie stellen Anzeichen für die diabetische Nephropathie (Mathiesen et al., 1995) aber auch für die Symptomatik der diabetischen Retinopathie (Klein et al., 1993) dar. Neben Veränderungen auf vaskulärer Ebene erfolgt bei der diabetischen Retinopathie zusätzlich eine Beeinträchtigung des neuronalen Gewebes. Es kommt zur Zerstörung der sogenannten neurovaskulären Einheit, bestehend aus Glia, Blutgefäßen und Nerven (Cunha-Vaz et al., 2014), und folglich zur Erblindung der betroffenen Patienten. Damit einhergehend konnte eine Reduktion von Neuronen bei Streptozotocin (STZ)-exponierten Ratten (Zeng et al., 2000) demonstriert werden. Die Degeneration von Nerven ist eine der häufigsten und schwersten Komplikation diabetischer Patienten (Atkin et al., 1995), unabhängig von der Ausbildung eines DM I oder DM II. Diese Symptomatik wird als diabetische sensorimotorische Polyneuropathie (DPN) bzw. auch als periphere Neuropathie bezeichnet. Diese zeigt sich typischerweise in der Ausbildung einer symmetrischen, vorrangig die kleinen Nervenfasern betreffenden, Neuropathie (Callaghan et al., 2012). Dyck et al. untersuchten in einer Langzeitstudie an 264 diabetischen Patienten über ungefähr sieben Jahre hinweg Risikofaktoren für bzw. Komplikationen der DPN. Dabei konnte die Arbeitsgruppe demonstrieren, dass mikrovaskuläre Erkrankungen wie Retinopathie und Proteinurie sowie die chronische Exposition durch eine Hyperglykämie, jedoch nicht die Nephropathie, mit dem Schweregrad der DPN im Zusammenhang stehen

(Dyck et al., 1999). Die periphere Polyneuropathie ist im frühen Stadium ihrer Manifestation durch einen Untergang der feinen Nervenfasern gekennzeichnet, ein Symptom, das primär zu detektieren ist (Sumner et al., 2003). Die diabetische Neuropathie betrifft sowohl die für den Schmerz verantwortlichen Fasern, Motoneurone und auch das autonome Nervensystem (Said, 2007). Es kommt dabei zur Degeneration und Regeneration myelinisierter und nicht myelinisierter Nervenfasern (Britland et al., 1990; Malik, 1997). Die genaue Ätiologie der diabetischen Neuropathie ist noch weitestgehend ungeklärt, jedoch spielen Veränderungen auf der vaskulären Ebene sowie Modifikationen des metabolischen Stoffwechsels eine Rolle. Eine Mikroangiopathie konnte bei diabetischen Patienten mit einer Neuropathie, u. a. auf Grundlage einer verminderten kapillären Dichte und einer verdickten Basalmembran, festgestellt werden (Malik, 1997), was zu einer Ischämie der Nervenfasern führte. Den größeren Risikofaktor stellt, neben den vaskulären Veränderungen, allerdings die entgleiste metabolische Stoffwechsellage dar. In den vergangenen Jahren wurden mehrere Hypothesen aufgezeigt, dass ein veränderter Glukosemetabolismus zur Degeneration der peripheren Nervenfasern führen könnte. In einer Langzeitstudie wurden Patienten mit einem Insulin-abhängigen DM I hinsichtlich der Entwicklung diabetischer Komplikationen beobachtet und parallel zur Senkung des BG-Spiegels mit Insulin therapiert (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Das Voranschreiten der untersuchten Langzeitkomplikationen Retinopathie, Nephropathie und auch die Neuropathie konnte über die intensive Behandlung bzw. Senkung der erhöhten BG verzögert werden. Die metabolischen Veränderungen stellen sich hauptsächlich durch eine verstärkte Aktivierung des Polyol-Pathways, erhöhtem oxidativem Stress und einer vermehrten nicht-enzymatischen Glykosylierung dar (Zychowska et al., 2013).

Bestimmte Organe bzw. Organsysteme, wie die Nieren, Retina, Blutgefäße und Nerven benötigen für die Aufnahme von Glukose kein Insulin, was bei erhöhter BG zur Aktivierung des Polyol-Pathways führt (De Vriese et al., 2000). Über die Aldose Reduktase kommt es zu einer erhöhten Produktion von Sorbitol, welches beispielsweise intrazellulär im Nervengewebe akkumuliert und somit zu einem osmotischen Stress führt (Dyck et al., 1988).

Die Akkumulation von Sorbitol und der daraus resultierenden Entstehung von Fruktose ist mit dem Schweregrad der diabetischen Neuropathie assoziiert (Dyck et al., 1988). Aus dem Polyol-Pathway heraus kommt es weiterhin bei bestehender Hyperglykämie zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen und damit zu erhöhtem oxidativen Stress (Sano et al., 1998; Chung et al., 2003). Dem folgt eine gesteigerte Permeabilität von Mitochondrien (Susin et al., 1997), was wiederum in Apoptose der betroffenen Zellen resultiert. Oxidativer Stress stellt demnach einen wichtigen Faktor dar, dem eine hohe Relevanz in der Ausbildung einer Polyneuropathie zugesprochen wird (Nagamatsu et al., 1995).

Eine weitere wichtige Rolle hinsichtlich metabolischer Veränderungen spielt die durch die Hyperglykämie induzierte, vermehrte nicht-enzymatische Glykosylierung von u. a. Proteinen, die zur Entstehung von AGEs führt und als Maillard Reaktion bezeichnet wird (John & Lamb, 1993). Dabei reagiert zunächst die freie Carbonylgruppe der Glukose mit der aminoterminalen Gruppe des Proteins zu einer reversiblen Schiff Base. Diese kann durch die strukturelle Umlagerung über die Entstehung des Amadori Produktes in einer irreversiblen Bildung von AGEs resultieren (Ahmed, 2005). Durch die Hyperglykämie läuft diese Reaktion und somit die Bildung intrazellulärer AGEs zusätzlich um ein Vielfaches schneller ab (Giardino et al., 1994). Die Akkumulation von AGEs im Gewebe korreliert mit dem Alter, der Dauer des DM und der kontrollierten Überwachung der BG (Kilhovd et al., 2003; Schalkwijk et al., 1999) Die in ihrer Struktur und Funktion veränderten glykierten Proteine liegen bei diabetischen Patienten in höherer Konzentration vor und führen wahrscheinlich zu den oben genannten Langzeitkomplikationen, u. a. auch zur Neuropathie (John & Lamb, 1993). Die nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen stellt einen wesentlichen Faktor für die diabetische periphere Neuropathie dar, die sowohl zu einer axonalen Dysfunktion als auch zu einer veränderten extrazellulären Matrix von Nervenfasern führen kann (King, 2001).

### 2.2.1 Die diagnostische Erfassung der diabetischen Polyneuropathie

Die DPN stellt die Hauptursache für die Entstehung von Fußulzera dar, die zu mehr als 80 % Fußamputationen führen (Boulton et al., 2005). Diabetische Patienten leiden daher unter einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität (Ribu et al., 2007). Auf Grund dessen ist die frühzeitige Erkennung der DPN von höchster Wichtigkeit und steht zusammen mit entsprechenden diagnostischen Verfahren im Vordergrund. Die periphere Neuropathie stellt die häufigste Komplikation des DM dar, wobei die kleineren Nervenfasern früher als die größeren betroffen sind (Hartemann et al., 2011). Die Diagnostik der DPN zählt hinsichtlich der unterschiedlichen Betroffenheit einzelner Nervenfasern mehrere verschiedene Methoden. Den gebräuchlichen neurophysiologischen Tests, bei denen feine Nervenfasern jedoch nicht erfasst werden können (Deli et al., 2013), steht die sog. quantitative sensorische Testung (QST) gegenüber. Hierbei wird durch die Setzung unterschiedlicher Reize der Haut, wie beispielsweise durch Nadelstiche, Vibration oder Temperaturveränderungen, die Wahrnehmung über die feinen sensorischen Nervenfasern diagnostiziert (Cruccu et al., 2010). Die Biopsie des Nervus suralis stellt eine weitere diagnostische Möglichkeit der diabetischen peripheren Neuropathie zur Erfassung pathologischer Veränderungen myelinisierter und nicht myelinisierter Nervenfasern dar (Malik et al., 2001). Herrmann et al. stellten in einer Patientenstudie einen Vergleich zwischen der Effektivität verschiedener Verfahren zur Detektion untergehender myelinisierter und nicht myelinisierter Nervenfasern auf (Herrmann et al., 1999). Dabei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Abnahme der Dichte von Nervenfasern der Epidermis und dem Nervus suralis sowie ein Trend zwischen der Korrelation nicht myelinisierter Nervenfasern der Epidermis und dem Nervus suralis demonstriert werden. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe eine Neuropathie kleiner Nervenfasern bei nur 23 % der Patienten feststellen, was ausschließlich über die Ermittlung der intraepidermalen Nervenfaserdichte über die Hautbiopsie gelang. Schlussfolgernd ist eine effektive Evaluation einer Neuropathie kleiner Nervenfasern nur über die Stanzbiopsie der Haut und nicht die des Nervus suralis zu erreichen (Lauria et al., 2005).

Die Stanzbiopsie der Haut ist ein im klinischen Gebrauch standardisiertes Verfahren zur Erfassung und Differenzierung feiner terminaler A $\delta$  und C Nervenfasern der Haut (Crucchi et al., 2010). Die Gewebeentnahme erfolgt unter Lokalanästhesie und wird am distalen Ende des Beins mit einer 3 mm Stanze durchgeführt (Lauria & Devigili, 2007). Løseth et al. konnten mittels der Hautbiopsie eine signifikante Abnahme der intraepidermalen Nervenfaserdichte bei Patienten ohne beeinträchtigter Nervenleitgeschwindigkeit, unabhängig vom Vorhandensein polyneuropathischer Symptome, feststellen (Løseth et al., 2008). Somit ermöglicht die Stanzbiopsie der Haut eine sensitivere Aussage über die Betroffenheit kleiner Nervenfasern im Vergleich zur QST zu treffen. Die Hautbiopsie ist ein minimal invasives diagnostisches Verfahren, was allerdings in seiner Wiederholbarkeit begrenzt ist. Trotz der Möglichkeit, feine Nervenfasern durch die schmerzhaft Biopsie des Nervus suralis und der weniger invasiven Stanzbiopsie der Haut zu detektieren, ist die konfokale Mikroskopie der Cornea (CCM) diesen Verfahren gegenüber überlegen.

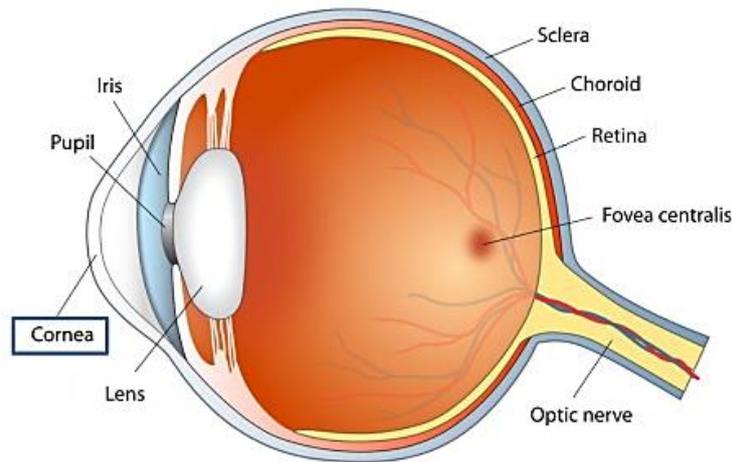
Die CCM ist ein *in vivo* Verfahren, welches nicht invasiv, zügig und zu jeder Zeit erneut durchführbar ist. Bereits während der Untersuchung lassen erste Eindrücke von Liveaufnahmen sogar schon die Aufstellung von Vermutungen hinsichtlich des Zustands cornealer Nervenfasern zu. Durch die *in vivo* CCM können feinste Nervenfasern detektiert werden (Rosenberg et al., 2000). Quattrini et al. konnten sogar einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Untergang von Nervenfasern in der Epidermis und der Cornea diabetischer Patienten feststellen (Quattrini et al., 2007). Malik et al. demonstrierten den Untergang cornealer Nervenfasern hinsichtlich der Abnahme der Nervenfaserdichte, der Nervenfasernlänge und der Dichte von Nervenfasernzweigstellen (Malik et al., 2003). Zusätzlich konnte diese Arbeitsgruppe einen tendenziellen Zusammenhang zwischen den pathologischen Veränderungen dieser Parameter und dem Schweregrad der Ausprägung des DM erheben. Tavakoli et al. zeigten, dass der durch die *in vivo* CCM ermittelte Untergang von Nervenfasern in der Cornea nicht mittels parallel durchgeführter QST bzw. neurophysiologischer Untersuchung von Nervenfasern der Haut erhoben werden konnte (Tavakoli et al., 2010). Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass die *in vivo* CCM ein

sehr sensitives diagnostisches Mittel darstellt. Bereits frühe Veränderungen cornealer Nervenfasern können erfasst werden, bevor die Ausprägung der peripheren Neuropathie so stark vorangeschritten ist, dass die Erkennung dann auch durch andere gebräuchliche Verfahren erfolgen könnte. Des Weiteren lässt sich durch eine repetitive Anwendung der *in vivo* CCM eine verlaufskontrollierte Betrachtung der cornealen Nervenfasern realisieren, wodurch eine Aussage über einen möglichen Therapieerfolg diabetischer Patienten gemacht werden kann.

Die Untersuchung der Cornea mittels der *in vivo* CCM ist demnach ein hervorragendes Verfahren zur Beurteilung peripherer Nervenfasern. Auf Grund dessen wird die Cornea als Biomarker für die periphere Neuropathie genutzt und gilt daher auch als ein „Fenster“ zur frühen Abschätzung pathologischer Nervenveränderungen (Ferrari et al., 2013).

### **2.3 Die Cornea – Anatomie und Physiologie**

Die Cornea präsentiert den vordersten Anteil des Bulbus und bedeckt die Pupille sowie auch die Iris (Abb. 1). Neben der Linse stellt die Cornea den ersten Gewebeanteil des Auges dar, welcher zu einem Anteil von 2/3 der Lichtbrechung dient, während der Linse ein Anteil von etwa 1/3 zukommt (Kaplan, 2007). Sie zeigt des Weiteren eine konvexe Form und ist untergliedert in drei morphologisch und funktionell unterschiedliche Zellschichten. Diese sind zum einen das oberflächliche Epithel, welches sich innerhalb der embryonalen Entwicklung aus dem oberflächlichen Ektoderm bildet und zum anderen das Stroma sowie das Endothel, die zu gleichen Teilen aus den Zellen der Neuralleiste hervorgehen (Kaplan, 2007). Die humane Cornea weist eine Dicke von ca. 599  $\mu\text{m}$  (Eckard et al., 2006) und die murine Cornea eine Dicke von ca. 100  $\mu\text{m}$  auf (Whitewar, 1960).

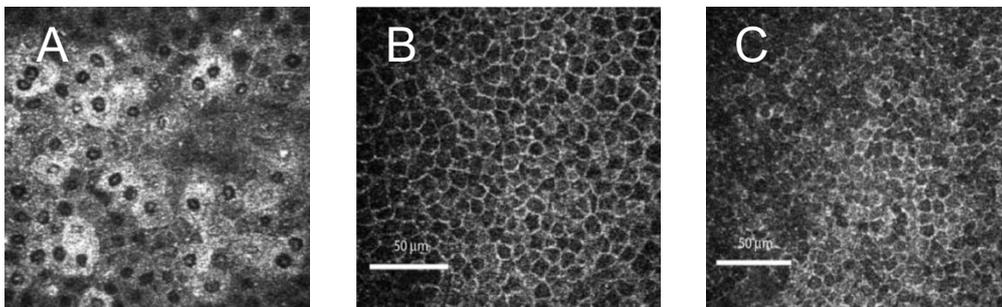


**Abb. 1** Schematische Darstellung des humanen Bulbus (modifiziert nach Frost et al., 2014).

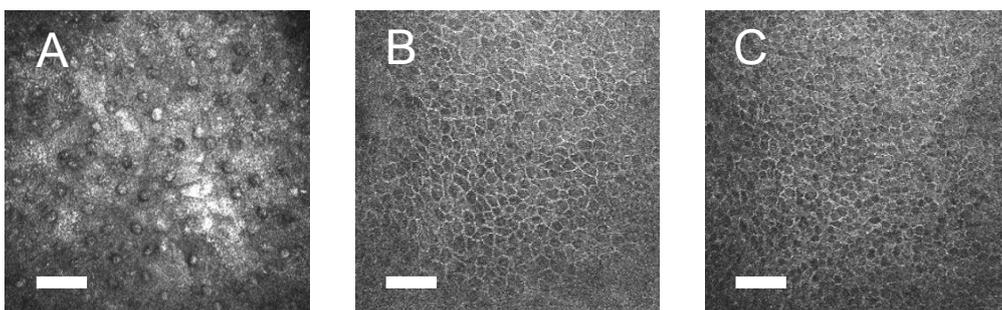
### Das Epithel der Cornea

Die Cornea zeigt durch ihren komplexen Aufbau verschiedene spezifische Eigenschaften, die sie für die Funktionalität des Visus unverzichtbar machen. Dabei ist zunächst das corneale Epithel zu erwähnen, welches dem direkten Kontakt mit der Umgebung und somit auch entsprechenden äußeren Einflüssen ausgesetzt ist. Eine gewisse Barriere gegen diverse Einflüsse bzw. Infektionen bietet der Tränenfilm (Farjo et al., 2009), der sich über die Cornea legt und durch jeden Lidschlag eine erneute Benetzung des Gewebes sicherstellt. Histologisch lässt sich eine Untergliederung in drei unterschiedliche Zellschichten vornehmen. Die Superfizialzellen stellen die oberste Schicht dar. Diese zeigen eine Breite von ungefähr 50  $\mu\text{m}$  (Dohlman, 1971) und weisen eine polygonale Zellmorphologie auf. Mittels der *in vivo* CCM lässt sich die Superfizialzelle durch ein helles Zytoplasma mit hellem Zellkern und einer ihn umgebenden hellen Region charakterisieren (Abb. 2 A und 3 A). Dabei beträgt die Zelldichte im Zentrum der Cornea ungefähr 624 Zellen/ $\text{mm}^2$  (Tomii & Kinoshita, 1994) im Gegensatz zu der Peripherie mit ungefähr 1213 Zellen/ $\text{mm}^2$  (Mustenonen et al., 1998). Die sich daran anschließenden Intermediärzellen werden auf Grund ihrer Zellmorphologie auch als „Wing Cells“ bezeichnet (Abb. 2 B und 3 B). Typischerweise zeigen diese Zellen eine relativ einheitliche Form mit einer ungefähren Größe von 20  $\mu\text{m}$  und einer Zelldichte, vom Zentrum hin zur Peripherie, von ca. 5000 Zellen/ $\text{mm}^2$  zu 5500 Zellen/ $\text{mm}^2$

(Guthoff et al., 2006). Des Weiteren lässt sich durch die *in vivo* CCM eine helle Zellgrenze mit dunklem Zytoplasma darstellen, welches die Differenzierung des Zellkerns wiederum erschwert. Die Zellen der Basalschicht des Epithels weisen, wie auch die Intermediärzellen, eine helle Zellgrenze auf, wobei das Zytoplasma in den Aufnahmen der *in vivo* CCM eine gewisse Heterogenität hinsichtlich der Reflektivität zeigt (Abb. 2 C und 3 C). Mit einer ungefähren Größe von 10  $\mu\text{m}$  sind die Basalzellen die kleinste Zellpopulation des cornealen Epithels. Jedoch haben sie mit 9000 Zellen/ $\text{mm}^2$  im Zentrum zu 10000 Zellen/ $\text{mm}^2$  in der Peripherie (Guthoff et al., 2006) die größte Zelldichte unter den einzelnen Epithelzellschichten.



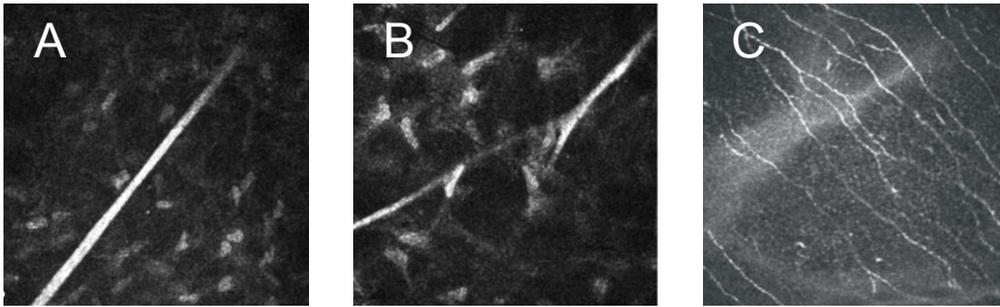
**Abb. 2** *In vivo* CCM Aufnahmen des Epithels der humanen Cornea. **A:** Superfizialzellen. **B:** Intermediärzellen. **C:** Basalzellen. (Guthoff et al., 2006).



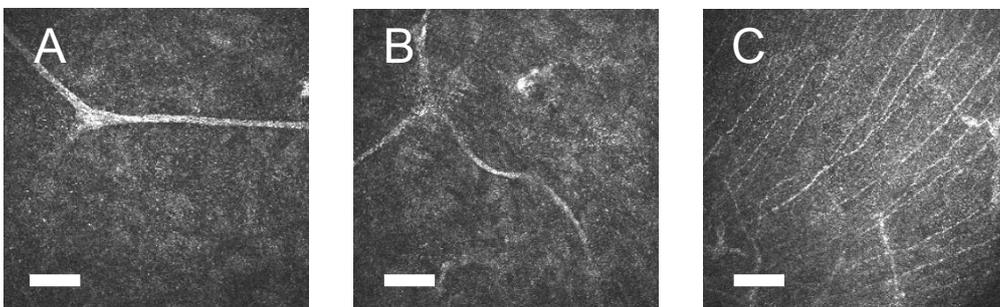
**Abb. 3** *In vivo* CCM Aufnahmen des Epithels der murinen Cornea. **A:** Superfizialzellen mit polygonaler Zellmorphologie, hellem Zytoplasma, hellem Zellkern und das den Zellkern umgebende dunkle Areal, Zellgröße ungefähr 50  $\mu\text{m}$ . **B:** Intermediärzellen/„Wing Cells“ mit heller Zellgrenze und dunklem Zytoplasma, Zellgröße ungefähr 20  $\mu\text{m}$ . **C:** Basalzellen mit heller Zellgrenze und unregelmäßig reflektierendem Zytoplasma, Zellgröße ungefähr 10  $\mu\text{m}$ . Skala, 50  $\mu\text{m}$ .

### Die Innervation der Cornea und Ausbildung des subbasalen Nervenplexus

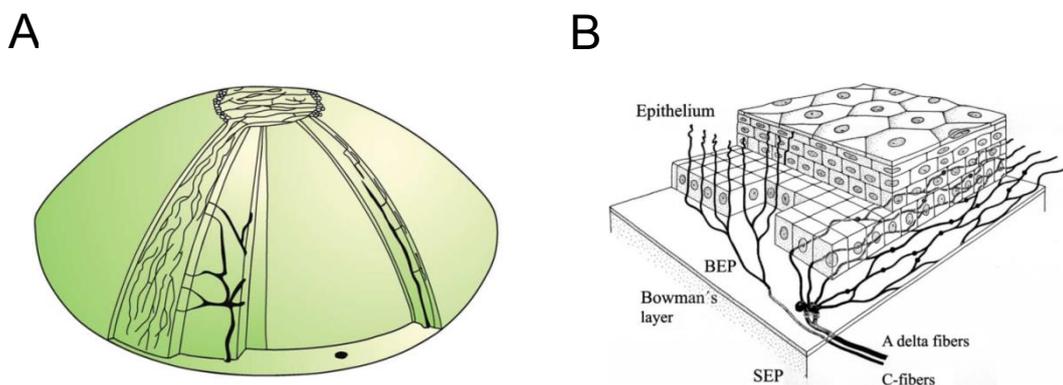
Die Cornea ist das am dichtesten innervierte Gewebe des gesamten Organismus und reich mit sensorischen und autonomen Nervenfasern ausgestattet. Die hauptsächliche Innervation ist jedoch sensorischen Charakters und erfolgt über die erste Abzweigung des Nervus trigeminus, dem Nervus ophthalmicus. Ein geringer Anteil der Cornea allerdings auch über den Nervus maxillaris, der zweiten Abzweigung des Nervus trigeminus, versorgt (Vonderahe, 1928). Die peripheren A $\delta$  und C Fasern münden als freie Nervenenden in das corneale Epithel hinein (Zander & Weddell, 1951). Zusätzlich ist die Cornea durch eine sympathische Innervation gekennzeichnet, welche in unterschiedlichem Maße zwischen Mensch und Maus, ausgeprägt ist (Marfurt & Ellis, 1993). Physiologisch treten die Nervenfasern in Form von Nervenfaserbündeln von der Peripherie ausgehend in die Cornea ein und verlieren dabei, auf Höhe des Limbus, das Perineurium sowie ihre Myelinscheide, worauf hin die Umhüllung nur noch durch die vorhandenen Schwann-Zellen erfolgt (Müller et al., 2003). Die stromalen Nervenfaserbündel (Abb. 4 A, 4 B; 5 A, 5 B) welche einen ungefähren Diameter von 20  $\mu$ m aufweisen, richten ihren Verlauf hin zur cornealen Oberfläche aus, wobei diese dann in Form einer oberflächenparallelen Anordnung unterhalb der Bowman Membran den subepithelialen Nervenplexus bilden (Müller et al., 1996). Ausgehend davon penetrieren einzelne terminale Nervenfasern die Bowman Membran, um den parallel angeordneten subbasalen Nervenplexus (SNP) zu formen (Schimmelpfennig, 1982) (Abb. 4 C, 5 C, 6 A, 6 B). Dabei konnten Guthoff et al. demonstrieren, dass sich die Lokalisation der A $\delta$  Fasern, welche sich morphologisch als eine „Perlenkette“ darstellen, strikt und unveränderlich unter der Basalzellschicht des Epithels befindet. Im Gegensatz dazu kommt es bei den C Fasern zu einer teilweise weiteren Untergliederung in weitere Nervenfasern, welche nach der Ausbildung des SNP in höhere Epithelschichten entsendet werden und dort blind enden (Guthoff et al., 2005) (Abb. 6 B). Beim Menschen (Patel & McGhee, 2005) sowie auch bei der Maus formen die Nervenfasern des SNP einen deutlichen Wirbel (Abb. 7 A, 7 B).



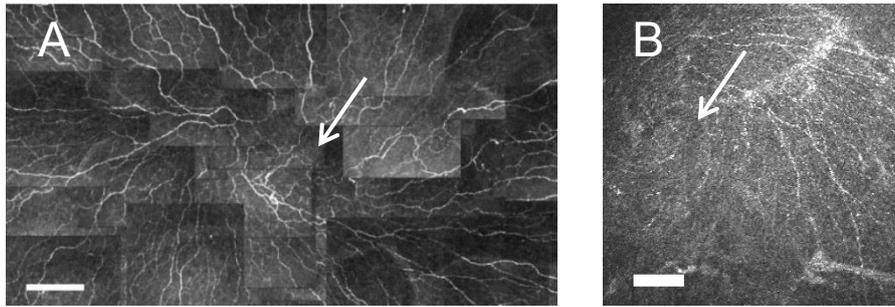
**Abb. 4** *In vivo* CCM Aufnahmen der Nerven der humanen Cornea. **A, B:** Nervenfaserbündel im anterioren Stroma. Hell reflektierende, ovale Keratozytenkerne (Guthoff et al., 2006). **C:** SNP mit paralleler Anordnung der Nervenfasern (Zhivov et al., 2013).



**Abb. 5** *In vivo* CCM Aufnahmen der Nerven der murinen Cornea. **A, B:** Nervenfaserbündel im anterioren Stroma. Keine Keratozytenkerne sichtbar. Skala, 50  $\mu\text{m}$ . **C:** SNP mit paralleler Anordnung der Nervenfasern.



**Abb. 6 A:** Schematische Darstellung der Verteilung der cornealen Nerven im Stroma und im SNP humaner Corneas (Müller et al., 2003). **B:** Schematische Darstellung der epithelialen Innervation der Cornea nach 3D Rekonstruktion; SEP, subepithelialer Plexus; BEP, basaler epithelialer Plexus (Guthoff et al., 2005).



**Abb. 7** *In vivo* CCM Aufnahme des zum Wirbel (Pfeil) geformten SNP. **A:** Humane Cornea. Skala, 200  $\mu\text{m}$ . (Patel & McGhee, 2005) **B:** Murine Cornea. Skala, 50  $\mu\text{m}$ .

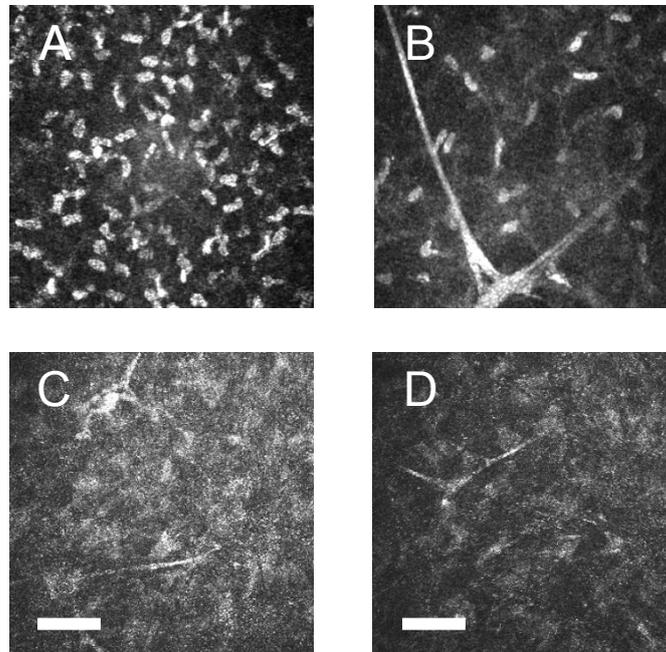
### Die Bowman Membran der Cornea

Die Bowman Membran (BM) stellt als amorphe azelluläre Schicht die Grenze zwischen dem Basalepithel und dem Stroma der Cornea dar. Sie ist gekennzeichnet durch eine unregelmäßige Anordnung von Kollagenfibrillen und hat im menschlichen Organismus eine ungefähre Dicke von 10  $\mu\text{m}$  (Guthoff et al., 2009). Die Cornea der Maus weist ebenfalls eine BM auf, welche 2 - 4  $\mu\text{m}$  umfasst (Reichard et al., 2010) und somit sehr dünn ist. In diesem Teil findet die Verzweigung der Nervenfaserbündel statt, die zur Ausbildung des SNP führt.

### Das Stroma der Cornea

Den größten Anteil der Cornea bildet das Stroma. Die Grundsubstanz, welche durch die im Stroma enthaltenen Keratozyten gebildet wird, ist durch Kollagenfasern definiert, die sich zu 1 - 2  $\mu\text{m}$  dicken und parallel angeordneten Lamellen zusammenlagern (Freegard, 1997). Das humane corneale Stroma ist gekennzeichnet durch klar abgegrenzte und hyperreflektive Zellkerne der Keratozyten, mit einem mit der *in vivo* CCM nicht sichtbaren Zytoplasma. Die Kollagenfasern sind ebenfalls nicht erkennbar (Guthoff et al., 2006), (Abb. 8 A, 8 B). Im Gegensatz dazu ist die Darstellung der Keratozytenkerne im murinen Stroma mittels der *in vivo* CCM nicht möglich (Reichard et al., 2010), jedoch sind reflektierende sternförmige

Strukturen erkennbar (Abb. 8 C, 8 D). Das anteriore Stroma weist den dichtesten Gehalt aller stromalen Nervenfasern auf (Müller et al., 2003).



**Abb. 8** *In vivo* CCM Aufnahme des anterioren Stromas der Cornea. **A, B:** Humanes anteriores Stroma mit hellen ovalen Keratozytenkernen und verzweigenden Nervenfasern (Guthoff et al., 2006). **C, D** Murines anteriores Stroma mit hellen sternförmigen Strukturen und verzweigenden Nervenfasern. Skala, 50  $\mu$ m.

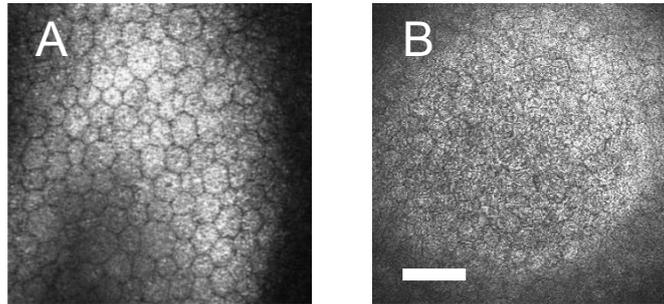
### Die Descemet-Membran der Cornea

Die amorphe Schicht wird vom darunter liegenden Endothel gebildet (Jun et al., 2006) und ist im physiologischen Zustand der Cornea durch ein unklares und zellfreies Erscheinungsbild gekennzeichnet (Tavakoli et al., 2008).

### Das Endothel der Cornea

Das Endothel ist ein Monolayer und durch regelmäßig hexagonal geformte Zellen charakterisiert. Diese zeigen dunkel erscheinende Zellgrenzen, ein helles Zytoplasma sowie

einen dunklen Zellkern, dessen Differenzierung nicht immer möglich ist (Abb. 9).



**Abb. 9** *In vivo* CCM Aufnahme des Endothels der Cornea mit der typisch regelmäßigen Anordnung der hexagonalen Zellen. **A:** Humanes Endothel (Guthoff et al., 2006). **B:** Murines Endothel. Skala, 50  $\mu\text{m}$ .

### 2.3.1 Die Cornea – ein hoch spezialisiertes Gewebe

Die Cornea ist in vielerlei Hinsicht eine Besonderheit eines jeden Organismus. Zum einen stellt sie zusammen mit dem Tränenfilm eine funktionstüchtige Barriere gegen äußere Einflüsse dar und zum anderen ist sie wesentlich an der Brechung eintreffender Lichtstrahlen beteiligt. Eine weitere hervorzuhebende Besonderheit ist die Avaskularität der Cornea, die ihre Begründung in der Notwendigkeit der Transparenz des Gewebes findet. Durch das vollständige Fehlen von Gefäßen ist die Vitalität der Cornea von anderen Prozessen abhängig, die zur Ernährung der Cornea beitragen und auch den Bedarf an Sauerstoff decken. Dabei sind folgende drei „Medien“ denkbar: der Tränenfilm, das Kammerwasser und der Gefäßplexus des Limbus. Der Tränenfilm, welcher sich direkt auf der Oberfläche der Cornea befindet, wird untergliedert in eine äußere Lipidschicht, eine mittlere wässrige Phase sowie in eine Muzinschicht (Holly & Lemp et al., 1977). Dabei beträgt die Dicke des Tränenfilms im menschlichen Auge ca. 3  $\mu\text{m}$  (Azartash et al., 2011) im Gegensatz zur Maus mit einer Dicke von ca. 7  $\mu\text{m}$  (Tran et al., 2003). Die in der wässrigen Schicht enthaltenen Elektrolyte, wie beispielsweise Kalium, Magnesium, Calcium und Natriumchlorid, tragen zur Aufrechterhaltung des cornealen Epithels bei (O'Leary et al., 1985). Parallel ist die Vitalität

des Epithels abhängig von der Bereitstellung von Glukose. Das wasserlösliche Molekül wird zu einem geringen Anteil in der Tränenflüssigkeit und über die limbalen Gefäße angeboten, jedoch in einem unzureichenden Ausmaß. Dahingegen ist das Kammerwasser ein potenterer Lieferant von Glukose, um nicht nur das Epithel, sondern auch das Stroma sowie das Endothel ausreichend zu ernähren (Dohlman et al., 1971). Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt durch dessen direkte Aufnahme aus der umgebenden Luft. Bei veränderter Zugänglichkeit zu Sauerstoff, wie beispielsweise durch das Tragen von Kontaktlinsen, kann es zu einem veränderten Metabolismus und zu einer azidotischen Stoffwechsellage der Cornea kommen (Chhabra et al., 2009).

Neben der Avaskularität wird die Transparenz der Cornea zusätzlich durch den präzisen strukturellen Aufbau des Stromas gewährleistet. Zum einen liegt eine parallele Anordnung der Kollagenfibrillen vor und zum anderen sorgen die umhüllenden Proteoglykane für eine regulierte Hydratation des Stromas. Der Zustand der relativen Dehydratation wird vor allem durch intrazelluläre und membranständige Ionenpumpen des Endothels gewährleistet. Unter Energieverbrauch wird ein osmotischer Gradient zwischen dem hypoosmotischen Stroma und dem hypertonen Kammerwasser aufrechterhalten. Somit ist ein passiver Flüssigkeitstransport ausgehend vom Stroma hin zum Kammerwasser möglich, um einen konstanten Wassergehalt von 78 % zu gewährleisten (Farjo et al., 2009). Weiterhin trägt die Abwesenheit der Myelinscheiden stromaler Nervenfasern ebenfalls zur Transparenz der Cornea bei (Müller et al., 2003).

## **2.4 Das Auge – ein immunprivilegiertes Organ**

Dem Auge wird ein hohes Maß an Interesse hingehend seiner Funktion und dessen Aufrechterhaltung zugesprochen. Obwohl das Auge keine lebensnotwendige Funktion erfüllt, bedeutet eine Einbuße des Augenlichts eine starke Einschränkung des Lebewesens. Das Immunsystem selbst spielt im Auge, wie auch in anderen Abschnitten des Körpers, eine wichtige Rolle, da das Auge im direkten Kontakt mit der Außenwelt steht und auf fremdartige

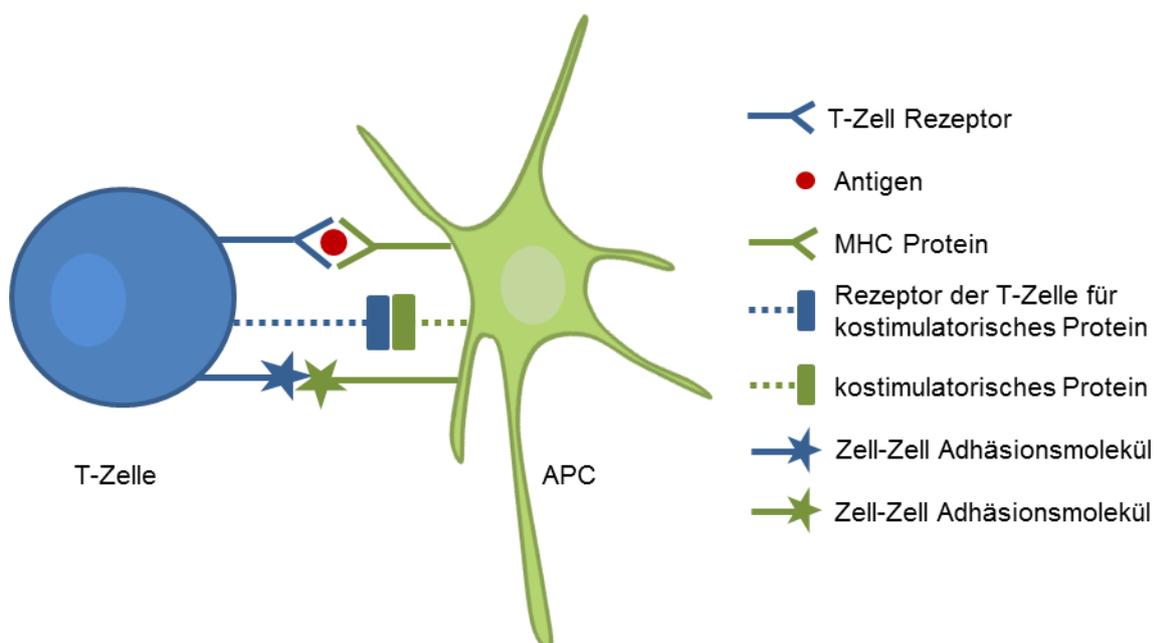
Einflüsse reagiert werden muss. Dies erfolgt jedoch in einem anderen Maße als es in anderen Organen bzw. Organsystemen der Fall ist. Die immunologischen Abläufe des Auges müssen sich den spezifischen, in ihrer Regenerationsfähigkeit eingeschränkten Gewebestrukturen anpassen, um Folgeschäden wie beispielsweise Narbenbildung zu vermeiden, welche möglicherweise zu einem eingeschränkten Visus oder sogar zur Blindheit führen könnten.

Das Immunprivileg des Auges wird durch drei Komponenten hauptsächlich erlangt (Hori, 2008). Zum einen ist dies die Eigenschaft, eine immunologische Toleranz zu entwickeln, die sogenannte Vorderkammer-assoziierte abweichende Immunantwort = anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). Die ACAID betitelt ein Phänomen, welches sich in einer Toleranzentwicklung gegenüber in die vordere Augenkammer implantierter Antigene präsentiert (Streilein, 1990). Auf Grund dessen ist die allogene Corneatransplantation durch eine entsprechend hohe Erfolgsrate gekennzeichnet. Des Weiteren spielt das intraokulare immunsupprimierende Mikroumfeld des Auges (Hori, 2008) in der Ausbildung des Immunprivilegs eine wesentliche Rolle, welches immunomodulatorische Faktoren umfasst, die in der vorderen Augenkammer exprimiert werden (Hori, 2008). Als letzte potente Größe zur Ausbildung des Immunprivilegs gilt die anatomische und zelluläre Barriere der Cornea (Hori, 2008). Bis vor kurzem wurde noch davon ausgegangen, dass die normale Cornea frei von aus dem Knochenmark stammenden Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), speziell Langerhans Zellen (LCs), ist (Nieder Korn, 1999) und sich darüber der besondere immunologische Status des Auges bzw. der Cornea erklären lässt. Dieses Dogma findet jedoch aktuellen Widerspruch, da unterschiedliche Populationen von APCs wie beispielsweise Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) in einem bestimmten Verteilungsmuster innerhalb der einzelnen cornealen Zellschichten bereits im physiologischen Zustand der Cornea nachzuweisen sind (Hamrah et al., 2003a). Residierende corneale DCs sind in der Lage, durch die Ausbildung von milzständigen regulatorischen T-Zellen, eine gewisse Toleranz des Gewebes gegenüber Antigenen zu entwickeln, was daher auch zum Phänomen der ACAID führt (Yan et al., 2014).

Schlussendlich erfolgte die Entwicklung des Immunprivilegs aus der Notwendigkeit heraus, dass das in seiner Regenerationsfähigkeit eingeschränkte Auge vor „unnötigen“ bzw. überschießenden immunologischen Reaktionen geschützt wird, um wiederum ein eingeschränktes Sehen oder auch Blindheit durch Folgen der Inflammation zu verhindern.

### 2.4.1 Antigen-präsentierende Zellen

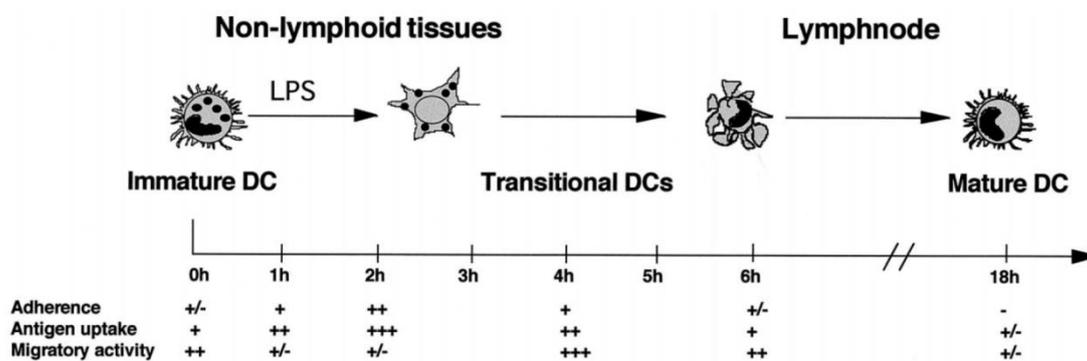
APCs übernehmen die essenzielle Funktion des Immunsystems, Antigene aufzunehmen, sie zu prozessieren und anschließend über die Zelloberfläche naiven T-Lymphozyten zu präsentieren. Zu den drei maßgeblichen APCs gehören DCs, Makrophagen und B-Zellen, die eine potente T-Zell Aktivierung über die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle erreichen können. Die Major Histocompatibility Complex (MHC) Proteine dienen dabei der Antigenpräsentation gegenüber des T-Zell Rezeptors und kostimulatorische Moleküle zur Bindung an komplementäre Rezeptoren der T-Zell Oberfläche. Zell-Zell Adhäsionsmoleküle sind für einen langanhaltenden Kontakt zwischen APC und T-Zelle nötig (Alberts et al., 2002) (Abb. 10).



**Abb. 10** Drei Arten verschiedener Proteine auf der Oberfläche von APCs, die an der Aktivierung einer T-Zelle beteiligt sind (modifiziert nach Alberts et al., 2002).

Die DC wurde initial durch Steinman & Cohn in der Milz der Maus beschrieben (Steinman & Cohn, 1973). Die zelluläre Entwicklung der DCs erfolgt dabei zumeist aus den Makrophagen-DC Vorläufern, woraus über die daraus entstehenden gemeinen DC-Vorläufer dann die Differenzierung in prä-DCs und reife plasmazytoide DCs hervorgeht (Paul & Amit, 2014). Die unreifen prä-DCs zirkulieren im Blut und differenzieren nach der Extravasation in zwei klassische konventionelle Subtypen. Dabei sind die  $CD8\alpha^+/CD103^+ CD11b^-$  DCs verantwortlich für die Antigenpräsentation gegenüber zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen und die  $CD8\alpha^-/CD103^+ CD11b^+$  DCs für die MHC II gekoppelte Antigenpräsentation und somit Aktivierung von  $CD4^+$  T-Zellen (Paul & Amit, 2014). Die konventionelle DC ist eine professionelle APC, die nach Antigenaufnahme aus dem peripheren Gewebe über das lymphatische System zu sekundären Lymphorganen migriert, um dort die Antigenpräsentation gegenüber naiven T-Zellen durchzuführen (Randolph et al., 2005). Die DC reguliert sowohl den angeborenen als auch den erworbenen Teil des Immunsystems (Banchereau & Steinman, 1998). Im Gegensatz zu Makrophagen ist es der DC beim Vorgang der Reifung möglich, durch eine stärkere Expression des Oberflächenmoleküls MHC II (Banchereau and Steinman, 1998), die Antigenpräsentation effektiver ablaufen zu lassen. Granucci et al. überprüften *in vitro* die Fähigkeit der Antigenpräsentation der DC, indem durch Lipopolysachharid (LPS)-Exposition ein inflammatorischer Stimulus gesetzt wurde (Granucci et al., 1999). Die zunächst immaturren DCs waren dabei in der Lage, durch ihre hohe endozytotische Aktivität, Antigene aufzunehmen (Sallusto et al., 1995) und in den Prozess der Reifung einzutreten. Nur wenige Stunden nach Setzung des inflammatorischen Stimulus sank die endozytotische Aktivität der DC, wobei, im Vergleich zur immaturren DC, die migratorische Aktivität deutlich erhöht war, sich aber wiederum im maturem Stadium senkte (Sallusto et al., 1995) (Abb. 11). Die reife DC weist im Gegensatz zur unreifen DC eine starke Expression von Oberflächenmolekülen (MHC II, CD86 und CD40) zur Antigenpräsentation auf (Granucci et al., 1999) und ist daher in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren.

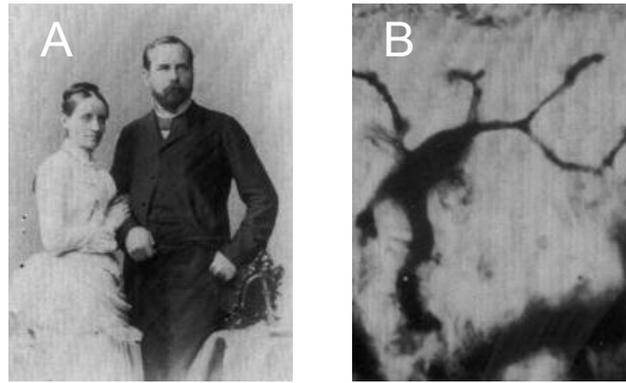
Der DC wird schlussfolgernd durch ihre wechselnden morphologischen und funktionellen Eigenschaften ermöglicht, das umliegende Gewebe auf Antigene zu prüfen, um diese zu erkennen und dann aufzunehmen. Durch eine erhöhte migratorische Aktivität erreicht sie lymphoide Organe, um dort gegenüber naiven T-Zellen das entsprechende Antigen zu präsentieren. Der DC kommt zusätzlich zur Induktion einer primären immunologischen Antwort eine essenzielle Rolle in der Entwicklung einer peripheren Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu (Banchereau & Steinman., 1998).



**Abb. 11** Übergangsstadien der Maturation von DCs unter Einfluss von LPS (Sallusto et al., 1995).

#### 2.4.1.1 Dendritische Zellen in der Cornea

Paul Langerhans beschrieb erstmalig die DC in der Epidermis der Haut als eine nicht-pigmentierte und dendritisch geformte Zelle, die er als LC betitelte (Langerhans, 1868). DCs bzw. LCs gehören der essentiellen Zellpopulation der APCs des Immunsystems an, wobei deren Vorkommen und Funktion indessen in vielen Geweben bzw. Organen, wie auch im Auge und speziell in der Cornea, beschrieben ist.



**Abb. 12 A:** Paul Langerhans mit seiner Ehefrau. **B:** Die Langerhans Zelle (Jolles, 2002).

Die Cornea des Auges verfügt über eine heterogene Population von APCs sowohl im Epithel als auch im Stroma. Dabei gelten DCs als professionelle APCs der Cornea (Nieder Korn, 1999). Hamrah et al. konnten  $CD45^+$  (Pan-Leukozytenmarker) Zellen im gesamten cornealen Epithel beobachten, was für die ursprüngliche Herkunft der Zellen aus dem Knochenmark spricht (Hamrah et al., 2002).

Die genaue Beschreibung der DC hingehend ihrer Morphologie, Funktion und eventuellen Kommunikation zu anderen zellulären Strukturen innerhalb der Cornea wird Gegenstand der aktuellen Arbeit sein. Daher wird an dieser Stelle auf die Diskussion verwiesen, in der eine detailgetreue Charakterisierung der DC im Fokus steht.

### 3 ZIELSTELLUNG

Die Polyneuropathie der Cornea wird hingehend ihrer Pathogenese aktuell kontrovers diskutiert. Dabei könnte das Immunsystem eine ganz wesentliche Rolle spielen. Daher wird in dieser Studie ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Untergang von Nerven und die Rekrutierung von DCs in die diabetische Cornea untersucht. Dies erfolgt vergleichend anhand des experimentellen Tiermodells der STZ-induzierten diabetischen Maus und der obese-Maus über einen Versuchszeitraum von neun Wochen. Mittels der etablierten Methode der *in vivo* CCM werden die Nervenfasern des SNP und die DCs quantifiziert.

Unterstützend findet zusätzlich die immunhistochemische Analyse der Cornea Anwendung, da über den Einsatz spezifischer Oberflächenmarker eine genaue Diskriminierung cornealer Nerven- und Immunzellen erfolgen kann.

## **4 MATERIAL UND METHODEN**

### **4.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten weibliche BALB/c- und B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse in einem Alter von 8 bis 12 Wochen. Sie entstammten der eigenen Zucht der dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock angeschlossenen Zentralen Versuchstierhaltung. Die Tiere wurden in entsprechenden Mausekäfigen gehalten, wobei der Boden mit Einstreu bedeckt war und Möglichkeiten zur Wahrnehmung physiologischer Verhaltensweisen wie Nestbau oder auch das Aufsuchen von Verstecken gegeben waren. Die Haltung erfolgte unter Einhaltung eines 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus. Den Tieren wurde über dem gesamten Versuchszeitraum Wasser und Futter ad libitum angeboten.

Der Tierversuch war gemäß dem Tierschutzgesetz §8 Abs. 1 durch die örtliche Tierschutzbehörde genehmigt.

### **4.2 Tiermodell**

#### **4.2.1 Modell des STZ-induzierten DM**

STZ ist ein diabetogenes Toxin und findet hingehend der chemischen Induktion eines DM I breite Anwendung (King, 2012). Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu Glukose wird STZ über den spezifischen Glukosetransporter 2 (GLUT2) selektiv von Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas aufgenommen (Elsner et al., 2000). In der Folge kommt es zu einem nahezu vollständigen Verlust der Insulinproduktion und der daraus resultierenden Hyperglykämie. Bei der Verabreichung von STZ gibt es die Variante der multiple-low-dose

Applikation, die eine selektive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und damit einhergehend immunologische Reaktionen gegen die pankreatischen Inseln hervorruft (Like & Rossini, 1976). Andererseits führt die Variante der high-dose Applikation von STZ direkt zur DNA-Schädigung und resultiert in einer massiven Nekrose der  $\beta$ -Zellen (Saini et al., 1996).

In dieser Studie wurden den BALB/c-Mäusen eine multiple-low-dose Gabe von STZ über einen Zeitraum von fünf aufeinander folgenden Tagen verabreicht. Daher repräsentiert dieses Design das Tiermodell des DM I.

#### **4.2.2 Modell der B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Maus**

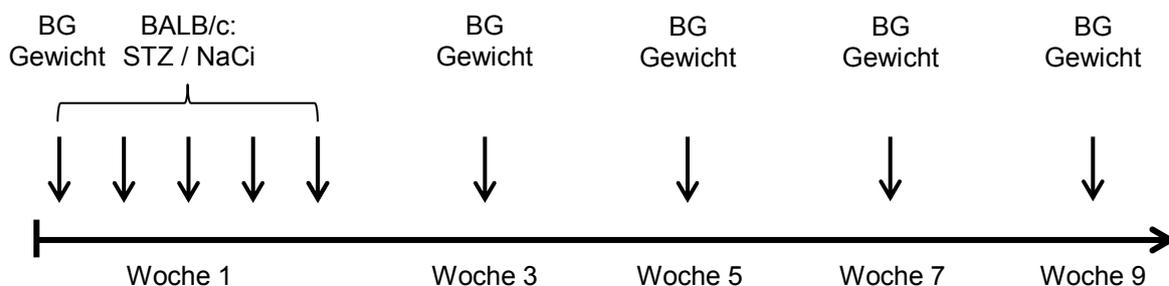
Der DM II wird durch eine Patientengruppe repräsentiert, die u. a. an einer veränderten Toleranz gegenüber Glukose, an Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Fettleibigkeit leidet. Diese Symptomatik wird in der aktuellen Studie durch das Modell der Leptin-defizienten obese- (B6.VLep<sup>ob/ob</sup>) Maus repräsentiert. Leptin reguliert als sogenanntes Sättigungshormon die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt (Srinivasan & Ramarao, 2007). Aus dessen Abwesenheit und der somit erhöhten Nahrungsaufnahme resultiert eine Hyperglykämie. Die Fettleibigkeit bzw. die Hyperphagie führt zu einem erhöhten Bedarf an Insulin und induziert somit eine Hypertrophie und Hyperplasie der pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Dies zeigt sich in einem vielfach höheren Volumen und in der sechsfach erhöhten Anzahl der  $\beta$ -Zellen im Vergleich zu normalgewichtigen Kontrolltieren (Gepts et al., 1960). Die dadurch entstandene Hyperinsulinämie führt zur Kompensation der Hyperglykämie und erklärt somit die nur zwischen der 8. und 12. Lebenswoche transient vorhandene BG-Erhöhung (Kennedy et al., 2010).

Die ob/ob-Maus repräsentiert u. a. das Tiermodell eines milden DM II (Drel et al., 2006) und findet daher auch in dieser Studie als solches seine Verwendung.

### 4.2.3 Induktion des DM I / II und dessen Überprüfung

Für die Induktion des DM I erhielten BALB/c-Mäuse ( $n = 7$ ) eine multiple-low-dose Gabe von 50 mg/kg/Körpergewicht (KGW) STZ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), welches in 0.05 M Natriumcitrat (NaCi) gelöst und intraperitoneal (i.p.) an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert wurde. Dies erforderte eine rasche Arbeitsweise, da STZ selbst in der gepufferten Trägersubstanz rasch zerfällt. Die Kontrollgruppe wurde entsprechend allein mit der Trägersubstanz NaCi und ebenfalls über fünf Tage behandelt. Drei Wochen nach der STZ-Injektion konnte eine stabile Hyperglykämie erzielt werden. Ob/ob-Mäuse ( $n = 5$ ) bildeten auf Grund ihres genetischen Defekts eine Hyperglykämie aus. Ihre schlanken Wurfgeschwister (ob/+) stellten die normoglykämie Kontrollgruppe dar.

Die Messung der BG (mmol/l) erfolgte einmal alle zwei Wochen über eine minimale Inzision der Schwanzvene mittels einer Kanüle. Nachdem der erste Blutropfen verworfen wurde, diente der zweite Blutropfen der BG-Analyse durch das BG-Meter Contour (Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland). Zudem erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des KGW.



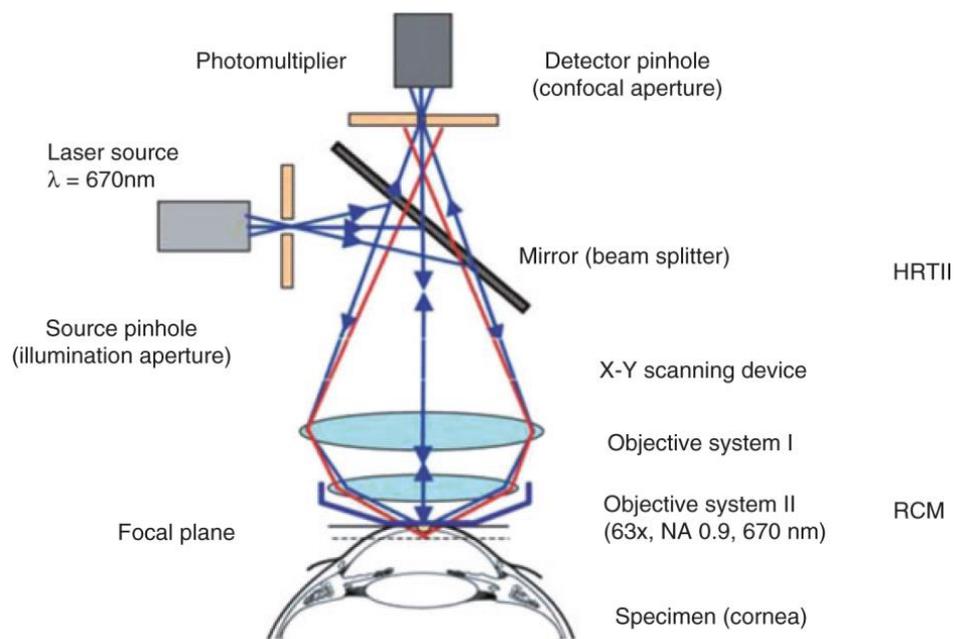
## 4.3 *In vivo* konfokale Mikroskopie

### 4.3.1 Grundlagen der *in vivo* konfokalen Mikroskopie

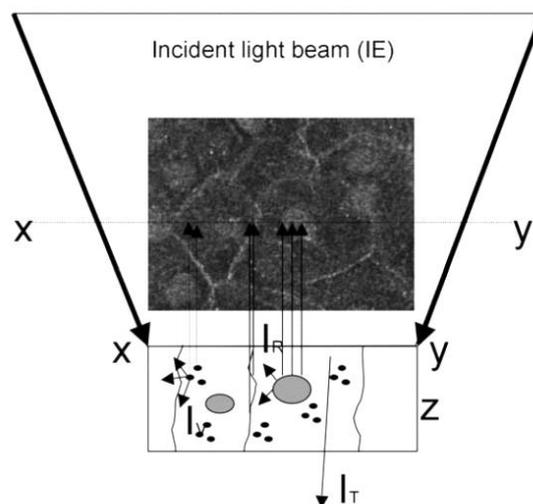
Die *in vivo* CM ist ein nicht-invasives diagnostisches Verfahren, welches mittels eines Laserstrahls das fokussierte Gewebe zur Lichtreflektion anregt. Pathologische

Veränderungen von Mikrostrukturen des zu untersuchenden Organs, wie beispielsweise der Cornea, spiegeln sich in einem veränderten Refraktionsindex wieder.

Die Heidelberg Retina Tomographie (HRT II) (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) stellt ein äußerst gut etabliertes bildgebendes System in der Glaukomdiagnostik, zur Detektion retinaler Veränderungen und pathologischer Modifikationen des Sehnervenkopfes dar (Hoffmann et al., 2009). Das HRT II wurde durch Stave et al. durch ein adaptives Linsensystem zu einem hoch auflösenden konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop modifiziert (Abb. 13) und als Rostock Cornea Module (RCM) (Universität Rostock, Deutschland) (Abb. 13) bezeichnet (Stave et al., 2002). Dabei wird ein Laserstrahl, ausgehend von einer Laser-Lichtquelle, durch eine Lochblende hin zu dem zu untersuchenden Punkt des Gewebes fokussiert. Der reflektierte Laserstrahl wird vom Strahlengang des Lasers durch einen Strahlenteiler separiert und durch eine zweite Lochblende hin zum lichtempfindlichen Detektor abgelenkt. Durch die Konfokalität des Systems wird ausschließlich Licht, welches aus der fokussierten Ebene heraus reflektiert wird, detektiert (Guthoff et al., 2006). Somit wurde die Möglichkeit geschaffen, die Cornea in ihren zellulären Strukturen hochauflösend darzustellen. Auf Grund der hohen Tiefenauflösung ist es möglich, optische Schnitte im Mikrometerbereich zu erzielen (Zhivov et al., 2006). Der Laserstrahl ist durch eine bestimmte Wellenlänge ( $\lambda$ ) definiert. Dabei durchdringt ein Teil des Lichtes das Gewebe unverändert, was als Transmission bezeichnet wird, wobei das restliche Licht auf Grund des zu analysierenden Gewebes verändert wird. Demnach erfolgt die bildliche Darstellung auf Grundlage der Rückwärtsstreuung des Lichtes von Grenzflächen, die innerhalb der Cornea durch die Verbindung zwischen Zytoplasma und extrazellulärer Matrix, Lipid-reichen Membranen, Zellkernmembranen und mitochondrialen Membranen gebildet werden (Abb. 14) (Guthoff et al., 2006). Grenzflächen mit rauen Oberflächen reflektieren Licht weitgehend diffus und solche mit glatten Oberflächen eher direkt in einem schmalen Muster. Zusätzlich wird die Rückwärtsstreuung des Laserstrahls beeinflusst durch die Größe der fokussierten Zellen und ebenfalls durch den Anteil an Zellorganellen (Guthoff et al., 2006).



**Abb. 13** Schematisch dargestelltes Prinzip des konfokalen Arrangements integriert in das HRT II + RCM System zur in vivo konfokalen Mikroskopie der Cornea. HRT, Heidelberg retina tomography; RCM, Rostock Cornea Module (Guthoff et al., 2009).



**Abb. 14** Das konfokale Bild eines Schnittes (x, y) wird erzeugt durch die Summe der zurück gestreuten Lichtintensitäten ( $I_r$ ) ausgehend von der fokalen Tiefenebene (z). ( $I_v$  Vorwärtsstreuung,  $I_t$  Transmission) (Guthoff et al., 2006).

### 4.3.2 Anästhesie der Versuchstiere

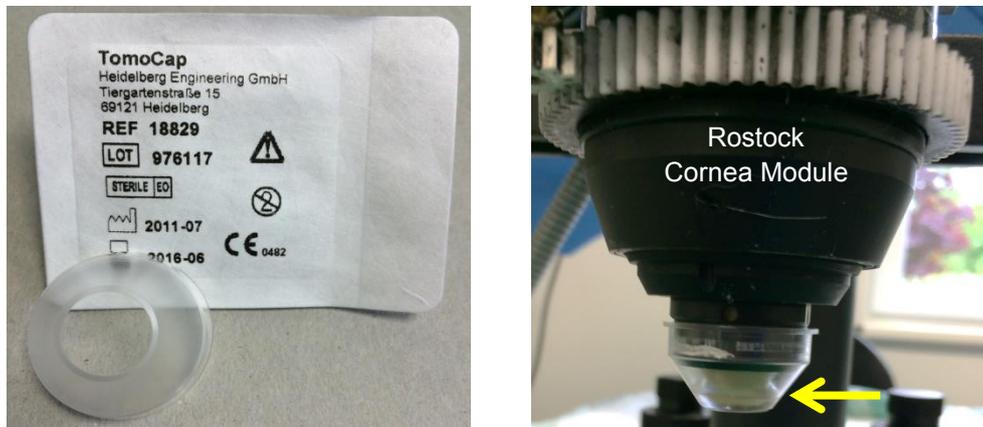
Vor jeder Untersuchung mittels der *in vivo* CCM bestand die Notwendigkeit, die Tiere zu narkotisieren, um eine Ruhigstellung zu erzielen, welche eine präzise Mikroskopie der Cornea ermöglichte. Minimale Eigenbewegungen des Bulbus waren auf Grund der Eigenpulsation des Organs nicht zu unterbinden, stellten jedoch kein Hindernis bezüglich der korrekten Aufnahme von Bildern dar. Ein jedes Tier wurde mit 75 mg/kg/KGW Ketamin (Ketamin®, bela-pharm, Vechta, Deutschland) und 5 mg/kg/KGW Xylazin i.p. (Rompun®, Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert.

### 4.3.3 Analyse muriner Corneas

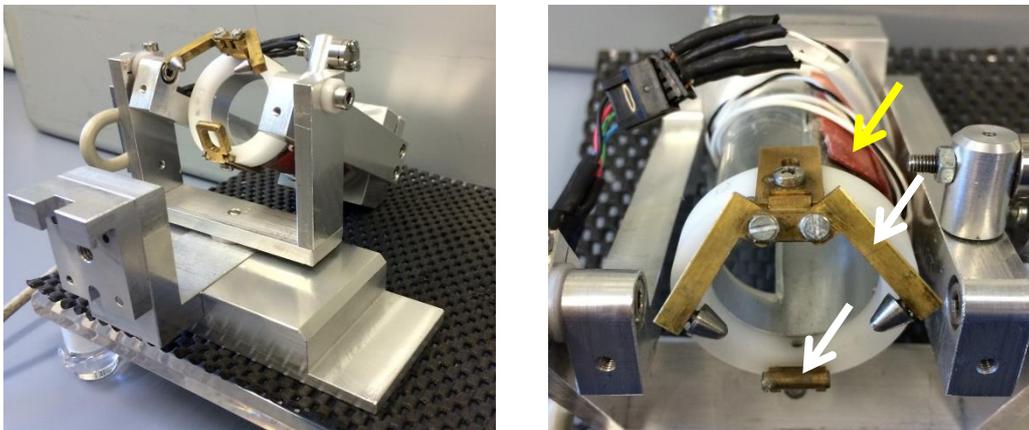
Die *in vivo* CCM wurde angewendet, um repetitiv über neun Wochen die cornealen Nervenfasern des SNP und die DCs im STZ-induzierten DM I sowie im ob/ob-Mausmodell des DM II zu verfolgen.

Da während der Narkose der Tiere kein Lidschlag erfolgt und somit die optimale Verteilung des Tränenfilms zur Versorgung der Cornea nicht mehr gegeben ist, wurde diese umgehend mit einem Gel (Vidisic®, Bausch & Lomb/Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) benetzt. Neben der Funktion des Schutzes vor Austrocknung der Cornea ist das Gel ebenfalls notwendig, um ein optimales Medium für den Laserstrahl zum Erreichen des Gewebes zu schaffen. Des Weiteren wird ein sog. TomoCap (TomoCap®, Heidelberg Engineering GmbH, Deutschland) (Abb. 15 A), eine Kappe mit planer Oberfläche, ebenfalls mit Gel befüllt und auf das Objektiv des RCM adaptiert (Abb. 15 B), um den notwendigen Abstand zwischen Cornea und dem Mikroskop während der Untersuchung aufrecht zu erhalten. Zur Fixierung der Maus diente ein sog. MouseFix Animal Holder (Steven GmbH, Ochtrup, Deutschland) (Abb. 16), der jedoch hinsichtlich des begrenzten Röhrenumfangs nur für den BALB/c-Mausstamm angewendet werden konnte (Abb. 17 A, 17 B). Für die Fixierung der ob/ob-Maus wurde eine hauseigene Apparatur, modifiziert nach dem MouseFix Animal Holder,

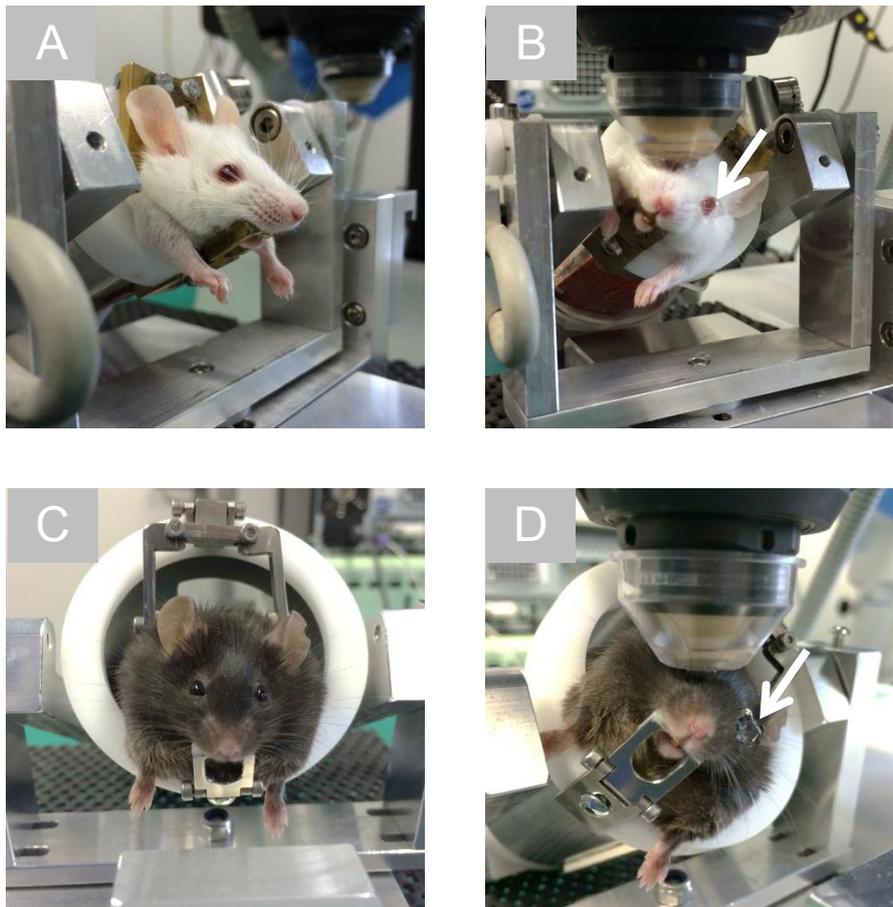
gefertigt, die durch einen größeren Röhrenumfang gekennzeichnet war (Abb. 17 C, 17 D). Die Körpertemperatur wurde bei 37°C durch eine integrierte Wärmematte aufrechterhalten.



**Abb. 15 A:** TomoCap als Abstandshalter zwischen Cornea und Mikroskop. **B:** Mit Gel befülltes TomoCap (Pfeil) adaptiert an das Rostock Cornea Module.



**Abb. 16** MouseFix Animal Holder mit rotierbarer Röhre um die eigene Längsachse und integrierter Wärmematte (gelber Pfeil) sowie Vorrichtungen zur Fixierung des Mausekopfes (weiße Pfeile).



**Abb. 17** Fixierung und Positionierung der BALB/c- (**A, B**) und der ob/ob- (**C, D**) Maus im für den jeweiligen Mausstamm vorgesehenen MouseFix Animal Holder zur Untersuchung der Cornea mittels der *in vivo* CCM. Die Cornea ist beidseitig mit Gel benetzt (weißer Pfeil) und das TomoCap ist ebenfalls mit Gel befüllt (**B, D**).

Die konvexe Cornea wird über die Regulation der z-Achse mittels des TomoCaps leicht berührt und anschließend sanft komprimiert, um das Gewebe relativ plan darstellen zu können. Vor der eigentlichen Untersuchung wurde das Zentrum der Cornea aufgesucht (Abb. 18 A). Dabei erfolgte die Orientierung an dem Wirbel der Nervenfasern des SNP, da dieser im zentralen Bereich der Cornea lokalisiert ist. Das zu untersuchende Gebiet wurde mäanderförmig gescannt (Abb. 18 B).



Die einzelnen cornealen Gesichtsfelder wurden hinsichtlich folgender Parameter mittels des semi-automatischen Programms ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), speziell NeuronJ als Plug-in (Analysis 3.1, Soft Imaging System, Münster, Deutschland) (Zhivov et al., 2013), ausgewertet (Abb. 19):

1. *dendritische Zelldichte (DCD, n/mm<sup>2</sup>)*

Die Anzahl aller DCs pro mm<sup>2</sup>.

2. *Nervenfaserdichte (NFD, mm/mm<sup>2</sup>)*

Die Länge aller Nervenfasern und deren Abzweigungen des SNP pro mm<sup>2</sup>.

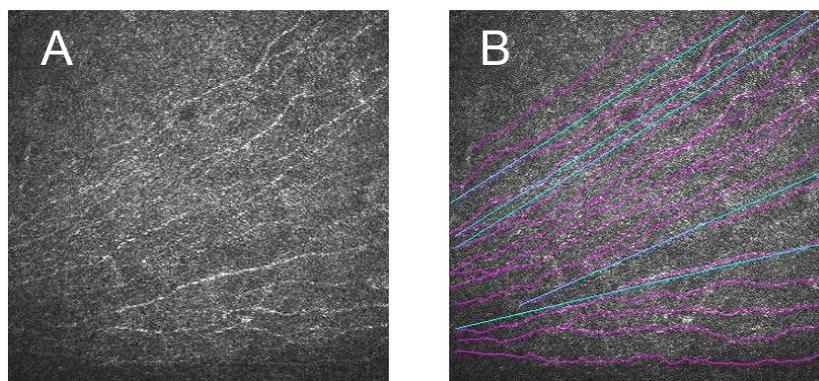
Die Berechnung erfolgte über den Faktor 0,78 µm/Pixel, erhalten aus der Anwendung der 300 µm Objektivlinse des HRT II/RCM (Reichard et al. 2014).

3. *Nervenfasertortuosität (NFT, in Grad)*

Grad der Nervenfaserverwindung. Grad 1 gerader Nervenverlauf, Grad 4 starke Abweichung des Nervenverlaufs (Mocan et al., 2006); Bestimmung anhand fünf verschiedener Nervenfasern pro Gesichtsfeld.

4. *Ko-Lokalisation von DCs und Nervenfasern des SNP (Ko-Lokalisation in %)*

Der prozentuale Anteil ko-lokalisierter DCs an der Gesamtanzahl der DCs.

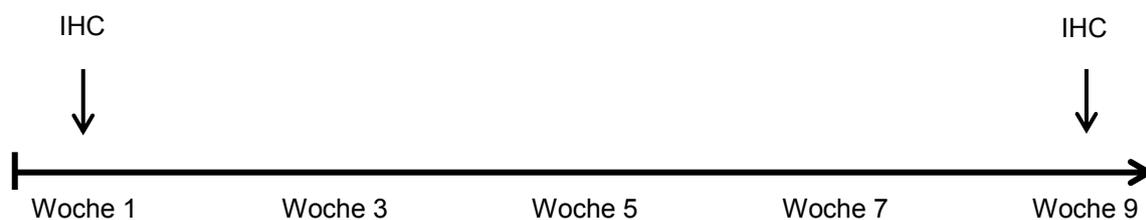


**Abb. 19 A:** *In vivo* CCM Aufnahme des cornealen SNP eines Gesichtsfeldes einer BALB/c-NaCi-Maus. **B:** Auswertung mittels des semi-quantitativen Programms ImageJ (pink: einzelne Nervenfasern des SNP; blau: Ermittlung der NFT anhand fünf verschiedener Nervenfasern).

## 4.4 Immunhistochemie (IHC) der Cornea

### 4.4.1 Gewebeprobenentnahme und Anfertigung von corneal whole mounts

Die immunhistochemische Aufarbeitung der Corneas erfolgte am Beginn der ersten oder nach der neunten Woche, um die jeweilige zelluläre Situation der Cornea, die quantitativ über ImageJ ausgewertet wurde, auch qualitativ mittels der Verwendung spezifischer Oberflächenmarker darzustellen.



Die anästhesierten Tiere wurden nach der *in vivo* CCM euthanasiert und einer beidseitigen Enukleation unterzogen. Die Anfertigung von sog. „corneal whole mounts“ erfolgte nach dem Protokoll von Dvorscak & Marfurt (Dvorscak & Marfurt, 2008). Die entnommenen Bulbi wurden direkt nach der Entnahme für 20 min bei Raumtemperatur (RT) in 4 % Paraformaldehyd (PFA) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), 0,2 % Pikrinsäure in 0,1 M phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Nachfolgend wurde, unter Beibehaltung der Linse, das anteriore Segment des Bulbus mittels eines Äquatorialschnittes von der posterioren Hälfte getrennt und für weitere 20 min in der oben genannten Fixierlösung fixiert. Daraufhin wurde die Linse entfernt, gefolgt von einem letzten Inkubationsschritt in der Fixierlösung von 20 min bei RT. Der nächste Schritt umfasste die vorsichtige Entfernung der Iris und den Zuschnitt der Cornea. Die vier bis sechs Inzisionen wurden mit einem ophthalmologischen Skalpell (pfm medical ag, Köln, Deutschland) durchgeführt und ergaben ein sternförmiges Muster (Abb. 20). Durch diese Gewebeeinschnitte wurde eine adäquate Planarität der ursprünglich konvexen Cornea erzielt.



**Abb. 20 A:** Ophthalmologisches Skalpell zur präzisen cornealen Schnittsetzung. **B:** Schematische Darstellung der Gewebeabflachung der corneal whole mounts mittels der Anwendung von vier (durchgehende Linien) bis sechs (gestrichelte Linien) Inzisionen.

Die Corneas wurden anschließend in 0,1 M PBS mit 30 % Sucrose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen, München, Deutschland) überführt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Um eine optimale Antikörperpenetration durch das corneale Gewebe zu erreichen, erfolgte eine weitere Inkubation in 0,1 % EDTA (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) und 0,01 % Hyaluronidase (type IV-S, product no. H4272; Sigma-Aldrich) in 0,1 M PBS, pH 5,3 für 24 Stunden bei 37°C und leicht schüttelnden Bewegungen. Anschließend wurden die corneal whole mounts einer dreimaligen 30-minütigen Waschung in PBS mit 0,3 % Triton X-100 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) unterzogen, um daraufhin in das Blocking-Serum, bestehend aus PBS-TX und 1 % bovinem Serumalbumin (BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), überführt zu werden.

#### 4.4.2 Eingesetzte Antikörper zur Zelldiskriminierung

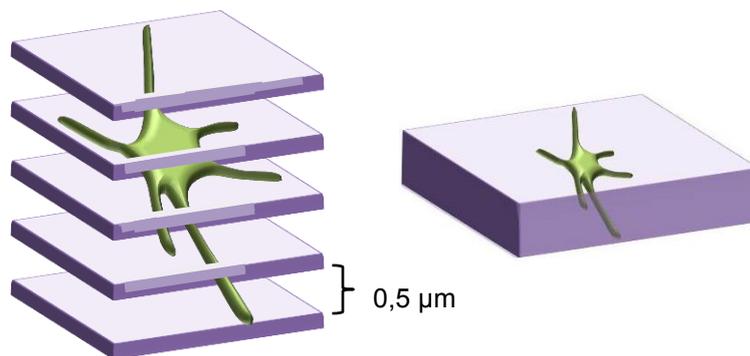
Zur Diskriminierung von aktivierten DCs wurden die Antikörper CD11c (purified anti-mouse CD11c, clone: N418, 1:200, BioLegend, San Diego, USA) und MHC II (I-A/I-E) (purified anti-mouse MHC class II, clone: M5/114.15.2, 1:200, eBioscience, Inc., San Diego, USA) in Kombination verwendet. Die Nervenfasern des SNP wurden unter der Verwendung des

Antikörpers neuronal class III  $\beta$ -Tubulin (TUJ1) (clone: TUJ1 1-15-79, 1:1000, Covance, Princeton, New Jersey, USA), einem pan-neuronalen Oberflächenmarker, gefärbt. Die Inkubation der cornealen Präparate zusammen mit den primären Antikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden dreimalig 30-minütige Waschungen mit PBS 0,3 % Triton X-100 durchgeführt. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern DyLight 488-konjugiert anti-hamster (Armenian) IgG (1:200; BioLegend), Alexa Fluor 555-konjugiert anti-rat (1:400; Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und Alexa Fluor 633-konjugiert anti-rabbit (1:400, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde für zwei Stunden bei 4°C durchgeführt. Nach einer erneuten Waschung von insgesamt 90 min mit PBS 0,3 % Triton X-100 erfolgte die Zellkernfärbung mit 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:1000, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und die anschließende Einbettung der corneal whole mounts auf einem Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) mittels des fluorescent mounting mediums (Dako, Jena, Deutschland).

#### **4.4.3 Analyse der corneal whole mounts mittels *in vitro* konfokaler Mikroskopie**

Die Mikroskopie der corneal whole mounts wurde an einem Olympus Fluoview FV 10i konfokalen Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Von jedem Präparat wurde initial eine Übersichtsaufnahme mit der 10-fachen Vergrößerung angefertigt, um hinsichtlich der Verteilung der DCs bei den diabetischen und den entsprechenden Kontrolltieren eine Aussage treffen zu können. Anschließend erfolgte die spezielle Betrachtung des cornealen Zentrums (Vergleichbarkeit zur *in vivo* CCM) mit einem 60-er Ölimmersionsobjektiv, um zusätzlich eine klare Diskriminierung der DCs, der Nervenfasern des SNP und deren Lage zueinander vorzunehmen. Da die Corneas als corneal whole mounts in ihrer Gesamtheit eingebettet werden, weisen sie im Gegensatz zu histologischen Einzelschnitten eines Organs den entscheidenden Vorteil auf, dass die DCs und Nervenfasern in der Ebene des SNP in ihrem gesamten Verlauf über die Aufnahme eines

sog. z-stacks (Abb. 21) erfasst werden können. Ein z-stack besteht aus mehreren einzelnen Bildausschnitten (in diesem Fall 6 - 9), die in einem Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  zueinander aufgenommen wurden. Abhängig vom Ausmaß des Verlaufs der Nervenfasern oder der Zellausläufer der DCs ergab sich eine definierte Anzahl an Bildausschnitten, die anschließend zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert wurden. Somit konnte eine genaue Beschreibung der Lokalisation von DCs und des Verlaufs der Nervenfasern erfolgen.



**Abb. 21** Schematische Darstellung eines durch das Olympus Fluoview FV 10i konfokalen Mikroskop aufgenommenen z-stacks einer DCs. **A:** Bildausschnitte des z-stacks, die ausschließlich einzelne Bestandteile der DC erfassen. **B:** Rekonstruierter z-stack, der die DC in ihrer Gesamtheit darstellt.

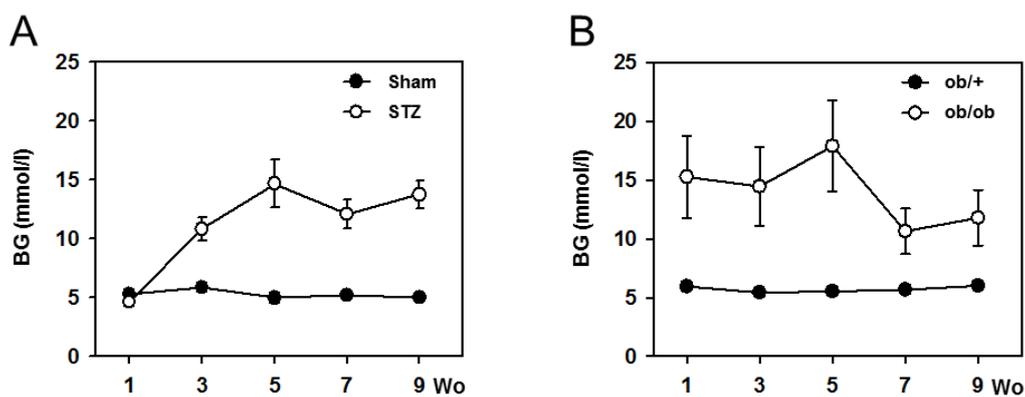
#### 4.5 Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurde zunächst SPSS Version 20.0. (Armonk, NY: IBM Corp.) GLM Repeated Measures ANOVA angewendet, um einerseits den Effekt des between-subject factor (Behandlung) und andererseits den within-subject factor (Zeit) zu analysieren. Durch die anschließende Auswertung der Daten mittels SigmaStat 3.5 Software (SigmaStat, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) wurden Unterschiede zwischen den Gruppen durch One Way Repeated Measures ANOVA und dem dazugehörigen Post-hoc Test bestimmt. Eine lineare Regressionsanalyse erfolgte zur Überprüfung eventuell vorhandener Korrelationen zwischen den Parametern BG, DCD und NFD. Als Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen.

## 5 ERGEBNISSE

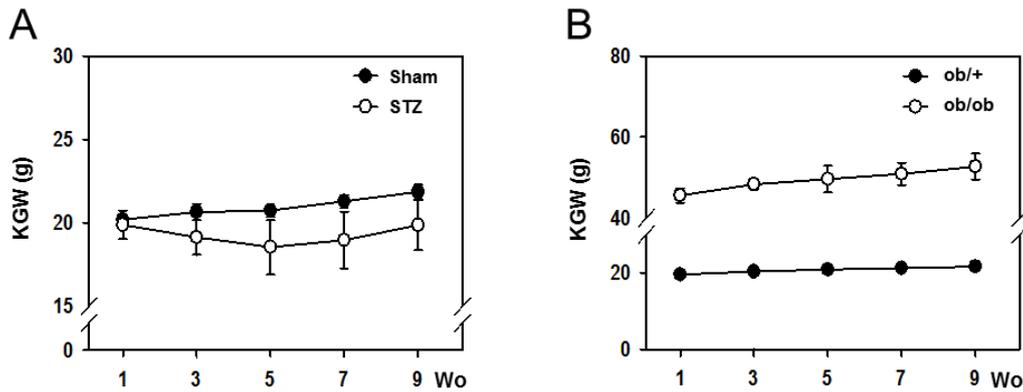
### 5.1 Zeitlicher Verlauf der Blutglukosekonzentration und des Körpergewichts der Versuchstiere

Die zur DM I-Induktion mit STZ behandelten BALB/c-Mäuse zeigten ungefähr zwei Wochen nach dem fünftägigen Applikationszeitraum einen Anstieg des BG-Wertes von im Mittel 4,6 mmol/l auf 10,8 mmol/l, der sich während des restlichen Experiments auf einen Wert von ungefähr 13,5 mmol/l einstellte (Abb. 22 A). Die ob/ob-Mäuse zeigten, entsprechend ihres veränderten Genotyps, bereits zum ersten Zeitpunkt der BG-Messung einen Wert von 15,2 mmol/l, der ab der fünften Woche einen Abfall auf 10,6 mmol/l in der siebten und 11,8 mmol/l in der neunten Woche aufwies (Abb. 22 B).



**Abb. 22** Durchschnittliche Blutglukosewerte der STZ- und NaCi-behandelten BALB/c Mäuse (n = 7) (**A**) sowie der ob/ob- und ob/+ -Mäuse (n = 5) (**B**).

Die NaCi-behandelten Tiere zeigten ein konstant zunehmendes KGW von im Mittel anfänglichen ~ 20 g und finalen ~ 22 g (Abb. 23 A), im Gegensatz zu den STZ-diabetischen Tieren, welche nach Induktion des DM einen leichten Abfall um ~ 1 g zeigten, um sich dann zur neunten Woche hin wieder auf ~ 20 g einzustellen (Abb. 23 A). Die ob/ob-Mäuse zeigten, im Gegensatz zum konstant bleibenden KGW ihrer schlanken ob/+ Wurfgeschwister (Abb. 23 B), entsprechend ihres Krankheitsbildes ein stetig zunehmendes KGW, welches anfänglich ~ 46 g betrug und final ~ 53 g erreichte (Abb. 23 B).



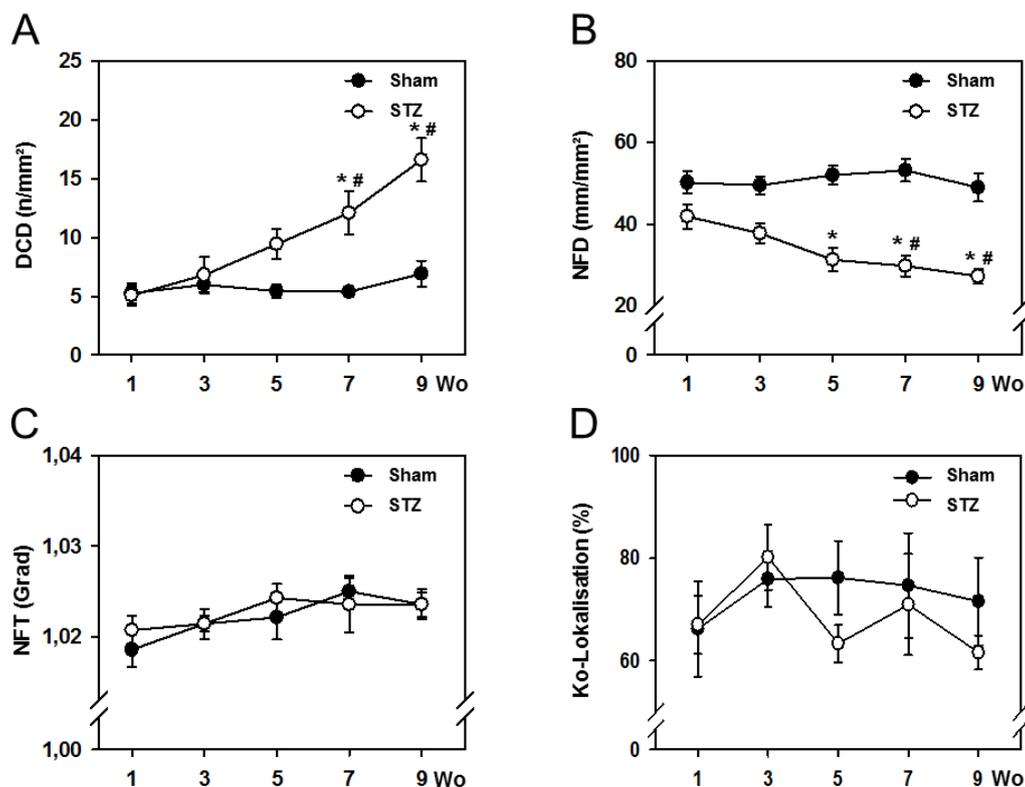
**Abb. 23** Durchschnittliches KGW der STZ- und NaCl-behandelten BALB/c Mäuse ( $n = 7$ ) (A) sowie der ob/ob- und ob/+ -Mäuse ( $n = 5$ ) (B).

## 5.2 *In vivo* konfokale Mikroskopie der Cornea (CCM)

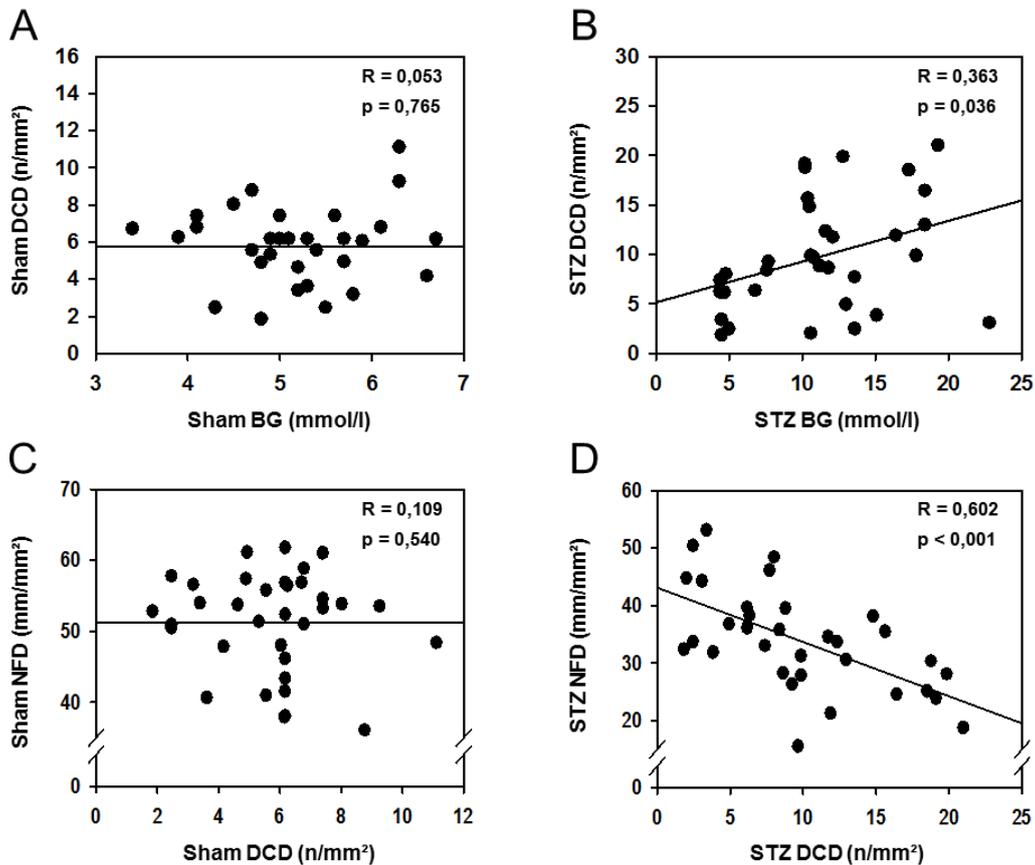
### 5.2.1 *In vivo* CCM von Mäusen mit STZ-induziertem Diabetes mellitus

Die Behandlung der BALB/c-Mäuse mit STZ führte zu einem sukzessiven Anstieg der cornealen DCD über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 24 A). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe eine relativ konstant bleibende DCD von  $5 \pm 1 / \text{mm}^2$  (Abb. 24 A). Zum Zeitpunkt der siebten und neunten Woche erreichten die Werte der STZ-Mäuse einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum dazugehörigen Wert der Kontrolltiere und dem gruppeninternen Ausgangswert. Die DCD der STZ-Mäuse in der neunten Woche betrug  $17 \pm 2 / \text{mm}^2$  und wies somit einen 3-fach höheren Wert, verglichen mit der DCD in der ersten Woche, auf (Abb. 24 A). Die Regressionsanalyse zeigte, dass die Zunahme der DCD der STZ-Mäuse signifikant positiv mit den steigenden BG-Werten korrelierte ( $R = 0,363$ ) (Abb. 25 B), was bei den Sham-Mäusen nicht beobachtet werden konnte ( $R = 0,053$ ) (Abb. 25 A). Hinsichtlich der NFD des cornealen SNP wurde bei den STZ-Mäusen ein signifikanter Abfall in der fünften, siebten und neunten Woche gegenüber den dazugehörigen Werten der Kontrolltiere sowie in der siebten und neunten Woche gegenüber dem gruppeninternen Ausgangswert beobachtet (Abb. 24 B). Die Regressionsanalyse zwischen der NFD und der DCD zeigte bei den Sham-Mäusen keinen Zusammenhang ( $R = 0,109$ ) (Abb. 25 C), während die STZ-Mäuse eine signifikant negative Korrelation beider Werte aufwiesen ( $R =$

0,602) (Abb.25 D). Die statistische Analyse mittels GLM Repeated Measures ANOVA konnte für die BG und NFD zeigen, dass der Zeit-Effekt und die Interaktion zwischen der Zeit und der Behandlung signifikant waren ( $p < 0,05$ ). Der Zeit-Effekt für die DCD war ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ). Die NFT der STZ-Mäuse zeigte mit einem durchschnittlichen Grad von 1,02 gegenüber den Sham-Mäusen keine Veränderungen über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 24 C). Die Ko-Lokalisation der STZ-Mäuse wies einen durchschnittlichen Wert von  $\sim 69\%$  auf, der sich ebenfalls während der gesamten neun Wochen gegenüber den Sham-Mäusen nicht signifikant veränderte (Abb. 24 D).



**Abb. 24** Quantitative Analyse der DCD (n/mm<sup>2</sup>) (A), der NFD (mm/mm<sup>2</sup>) (B), der NFT (Grad) (C) und der Ko-Lokalisation (%) (D) von NaCi- und STZ-behandelten BALB/c-Mäusen über einen Zeitraum von neun Wochen. NaCi-behandelte Mäuse (n = 7) dienten als normoglykämie Kontrolltiere (sham) und STZ-behandelte Mäuse (n = 7) repräsentierten hyperglykämie DM I Mäuse (STZ). MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  vs. Sham an den zugehörigen Zeitpunkten; #  $p < 0,05$  vs. 1 Woche.

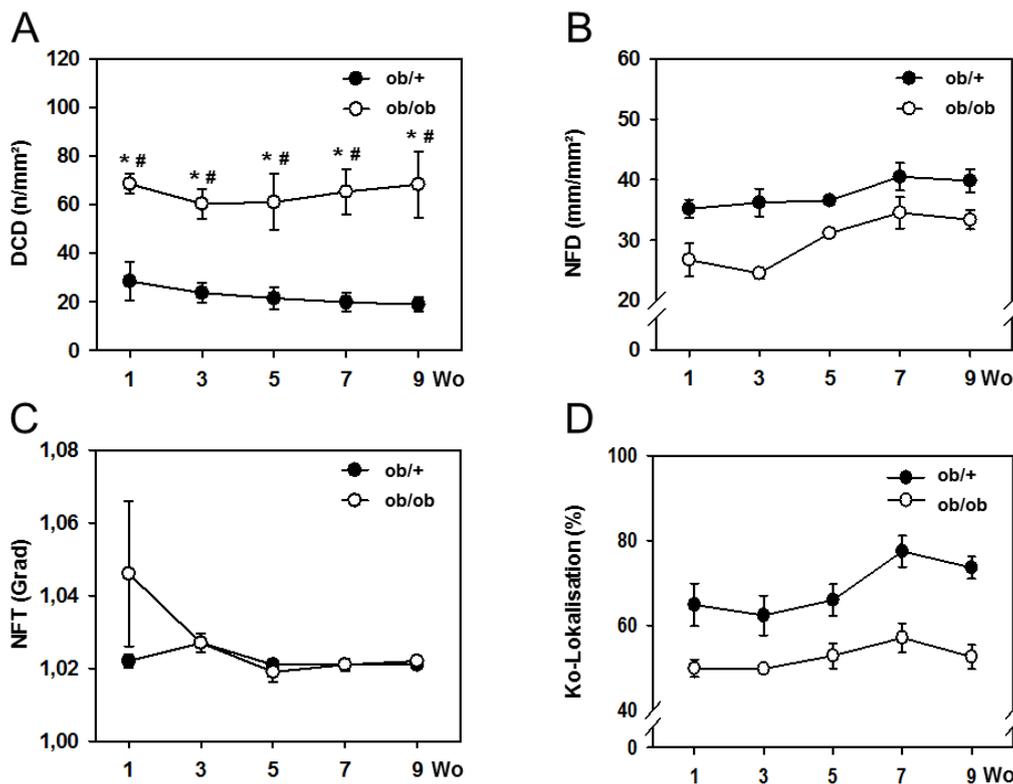


**Abb. 25** Regressionsanalyse zwischen BG (mmol/l) und DCD (n/mm<sup>2</sup>) bei NaCl-behandelten Sham-Mäusen (n = 7) (A) und STZ-behandelten Mäusen (n = 7) (B) sowie Regressionsanalyse zwischen DCD (n/mm<sup>2</sup>) und NFD (mm/mm<sup>2</sup>) bei NaCl-behandelten Sham-Mäusen (n = 7) (C) und STZ-behandelten Mäusen (n = 7) (D). R, Regressionskoeffizient.

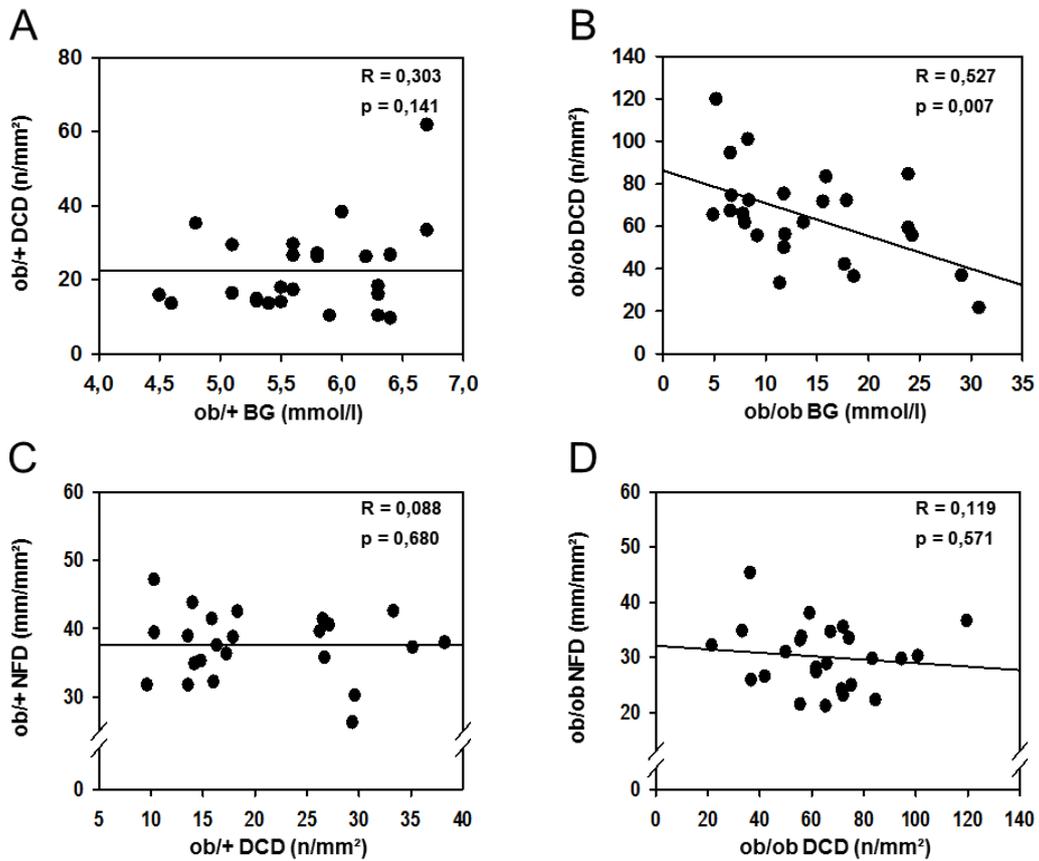
### 5.2.2 *In vivo* CCM Analyse von ob/ob-diabetischen Mäusen

B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse zeigten hinsichtlich der analysierten Parameter gegenüber den BALB/c-Mäusen ein grundlegend anderes Niveau der Werte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Bei den ob/ob-Mäusen konnte bereits ab der ersten Woche eine signifikant hohe DCD von  $69 \pm 4$  / mm<sup>2</sup> gegenüber den ob/+ -Mäusen ( $29 \pm 8$  / mm<sup>2</sup>) beobachtet werden (Abb. 26 A). Dieses signifikant erhöhte Level präsentierte sich während des gesamten Versuchszeitraums in einer relativen Konstanz bis zu einem Wert von  $68 \pm 14$  / mm<sup>2</sup> in der neunten Woche (Abb. 26 A). Die Regressionsanalyse der ob/ob-Mäuse zwischen den BG-Werten und der DCD zeigte eine signifikant negative Korrelation (R = 0,527) (Abb. 27 B),

verglichen mit den entsprechenden Werten der ob/+ -Mäuse ( $R = 0,303$ ) (Abb. 27 A). Die NFD der ob/ob-Mäuse zeigte gegenüber den ob/+ -Mäusen geringere Werte über alle neun Wochen hinweg (Abb. 26 B). Die Regressionsanalyse zwischen der DCD und der NFD bei den ob/+ - ( $R = 0,088$ ) (Abb. 27 C) und ob/ob-Mäusen ( $R = 0,119$ ) (Abb. 27 D) zeigte jeweils keine signifikante Korrelation. Die statistische Analyse mittels GLM Repeated Measures ANOVA konnte für die NFD eine Signifikanz hinsichtlich des Zeit-Effektes zeigen ( $p < 0,05$ ). Die NFT der ob/ob-Mäuse zeigte einen durchschnittlichen Grad von 1,02 und somit gegenüber den Sham-Mäusen keine signifikanten Veränderungen über den gesamten Versuchszeitraum (Abb. 26 C). Der Wert der Ko-Lokalisation der ob/ob-Mäuse lag während des gesamten Versuchszeitraums unterhalb dem der ob/+ -Mäuse mit einem durchschnittlichen Wert von  $\sim 52\%$  (Abb. 26 D).



**Abb. 26** Quantitative Analyse der DCD (n/mm<sup>2</sup>) (A), der NFD (mm/mm<sup>2</sup>) (B), der NFT (Grad) (C) und der Ko-Lokalisation (%) (D) von ob/+ - und ob/ob-Mäusen über einen Zeitraum von neun Wochen. Ob/+ -Mäuse (n = 5) dienten als normoglykämie Kontrolltiere (ob/+) und ob/ob-Mäuse (n = 5) repräsentierten hyperglykämie DM II Mäuse (ob/ob). MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  vs. Sham an den zugehörigen Zeitpunkten; #  $p < 0,05$  vs. 1 Woche.

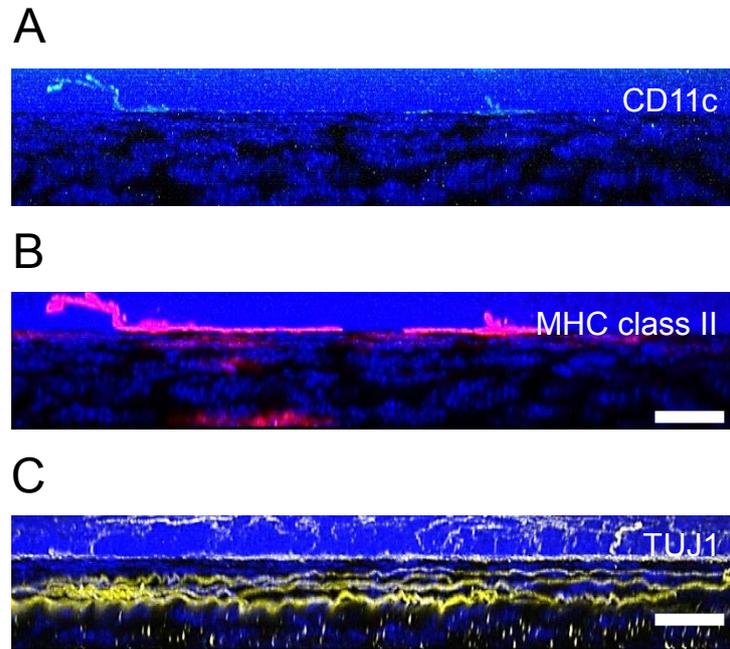


**Abb. 27** Regressionsanalyse zwischen BG (mmol/l) und DCD (n/mm<sup>2</sup>) bei *ob/+*-Mäusen (n = 5) (A) und *ob/ob*-Mäusen (B) sowie Regressionsanalyse zwischen DCD (n/mm<sup>2</sup>) und NFD (mm/mm<sup>2</sup>) bei *ob/+*-Mäusen (n = 5) (C) und *ob/ob*-Mäusen (D). R, Regressionskoeffizient.

### 5.3 *In vitro* konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts

Die konfokale Mikroskopie der corneal whole mounts ermöglicht eine präzise Aussage über die Lokalisation der zellulären Strukturen der Cornea zu treffen und diese auf Grund der detailgetreuen bildlichen Darstellung eindeutig zu identifizieren. Wie bereits mittels der *in vivo* CCM das Zentrum der Cornea um den SNP herum analysiert wurde, erfolgte die *in vitro* konfokale Mikroskopie ebenfalls in diesem Bereich. Über die Anfertigung eines initialen z-stacks von ungefähr 55 einzelnen Bildausschnitten in einem Abstand von 0,5  $\mu\text{m}$  konnten eindeutig CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs zwischen dem Epithel und dem Stroma erfasst werden (Abb. 28 A, 28 B). Die Zellkörper der muren DCs befanden sich auf Höhe des Basalepithels und ihre Zellausläufer ragten dabei ausschließlich hin zur Oberfläche der

Cornea. Die Nerven konnten ebenfalls dargestellt werden und präsentierten sich als relativ dicke Nervenfaserbündel des Stromas, welche sich unterhalb des Epithels in den SNP aufgliederten, um dann weitere feine Nervenfasern zwischen den verschiedenen Ebenen des Epithels hin zur Oberfläche der Cornea zu entlassen (Abb. 28 C).

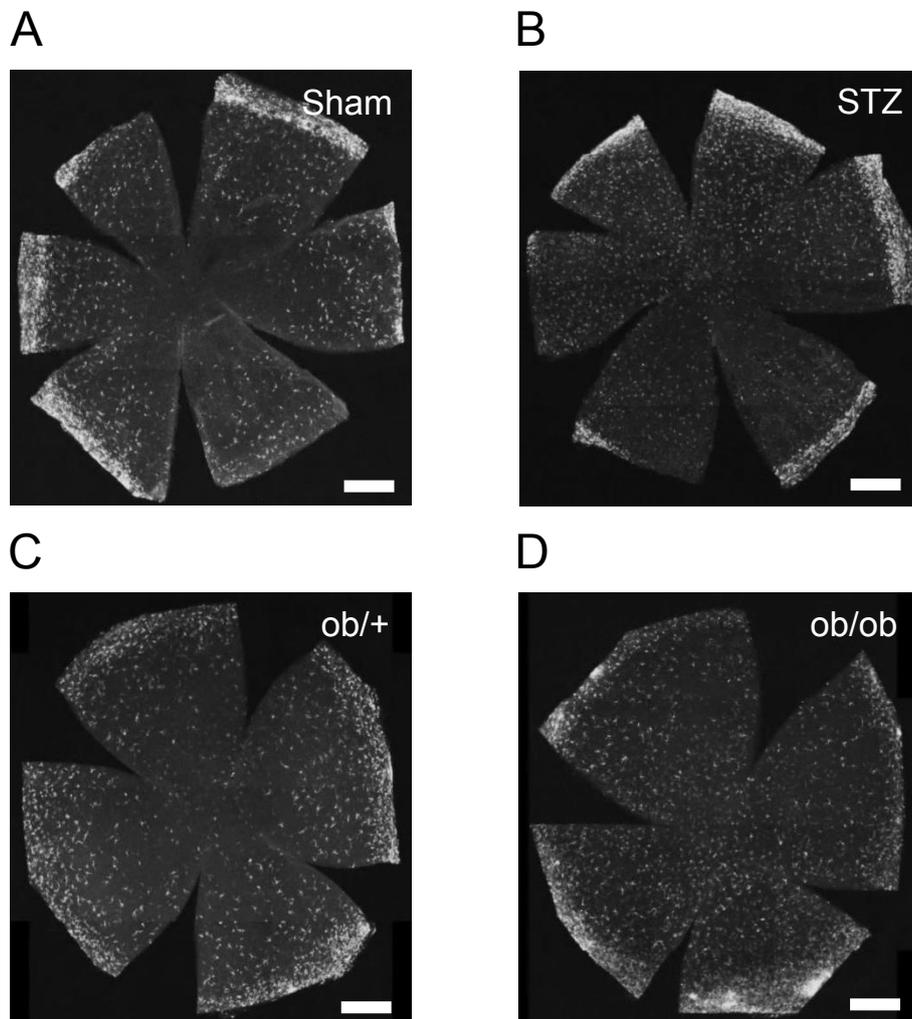


**Abb. 28** Lokalisation von DCs und Nervenfasern innerhalb des Epithels und des anterioren Stromas der Cornea. Die Aufnahmen wurden über die dreidimensionale Rekonstruktion eines z-stacks eines corneal whole mount Präparates einer normoglykämischen BALB/c-Maus angefertigt. Die DCs exprimieren den Oberflächenmarker CD11c (**A**) und MHC II (**B**). Die Zellkörper der murenen DCs befinden sich zwischen den Zellen des Basalepithels. Die dendritischen Zellausläufer richten sich hin zur Oberfläche der Cornea (**A**, **B**). Class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> (TUJ1) Nervenfaserbündel des Stromas entlassen einzelne feine Nervenfasern, um den SNP zwischen dem Epithel und dem anterioren Stroma zu bilden (**C**). Epithel, dicht zusammengelagerte DAPI-positive Zellkerne. Stroma, locker angeordnete DAPI-positive Zellkerne. Skala, 30  $\mu$ m.

### 5.3.1 Corneal whole mounts von STZ-induzierten und ob/ob-diabetischen Mäusen

Zum Zeitpunkt der neunten Woche wiesen die Corneas der STZ-behandelten BALB/c-Mäuse, im Gegensatz zu den NaCl-behandelten BALB/c-Mäusen, einen abnehmenden Gradienten von CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs, ausgehend von der Peripherie zum Zentrum hin,

auf (Abb. 29 A, 29 B). Das gleiche Bild zeigte sich bei den ob/+ und ob/ob-Mäusen (Abb. 29 C, 29 D), jedoch mit dem Unterschied der basal höheren Zelldichte der B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Mäuse verglichen mit den BALB/c-Mäusen.

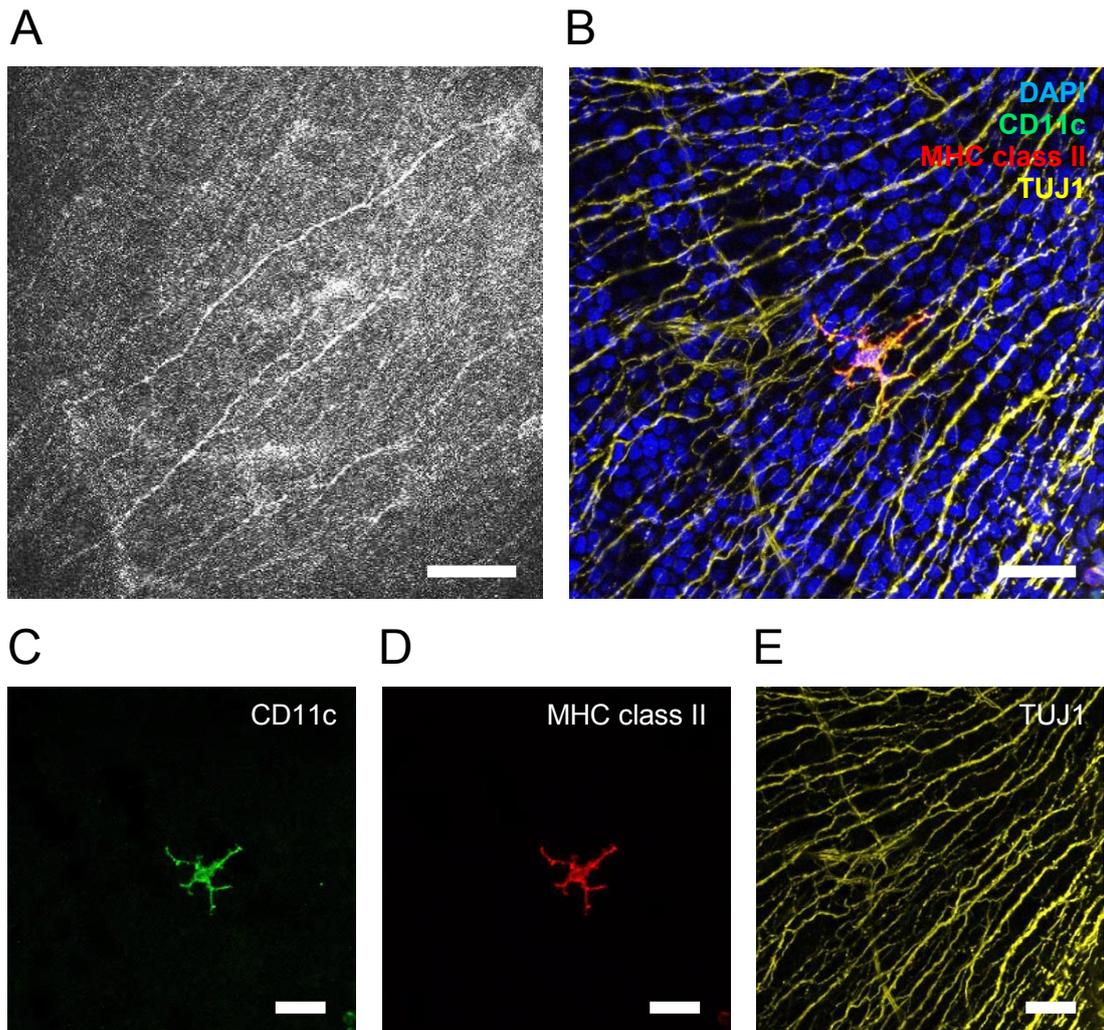


**Abb. 29** Verteilung von CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs von corneal whole mounts. Die Bilder wurden mittels eines 10er Objektivs aufgenommen. Im Gegensatz zu den Sham- (A) und den ob/+ -Mäusen (C) zeigen STZ- (B) und ob/ob-Mäuse (D) eine höhere Dichte an DCs. Skala, 500 µm.

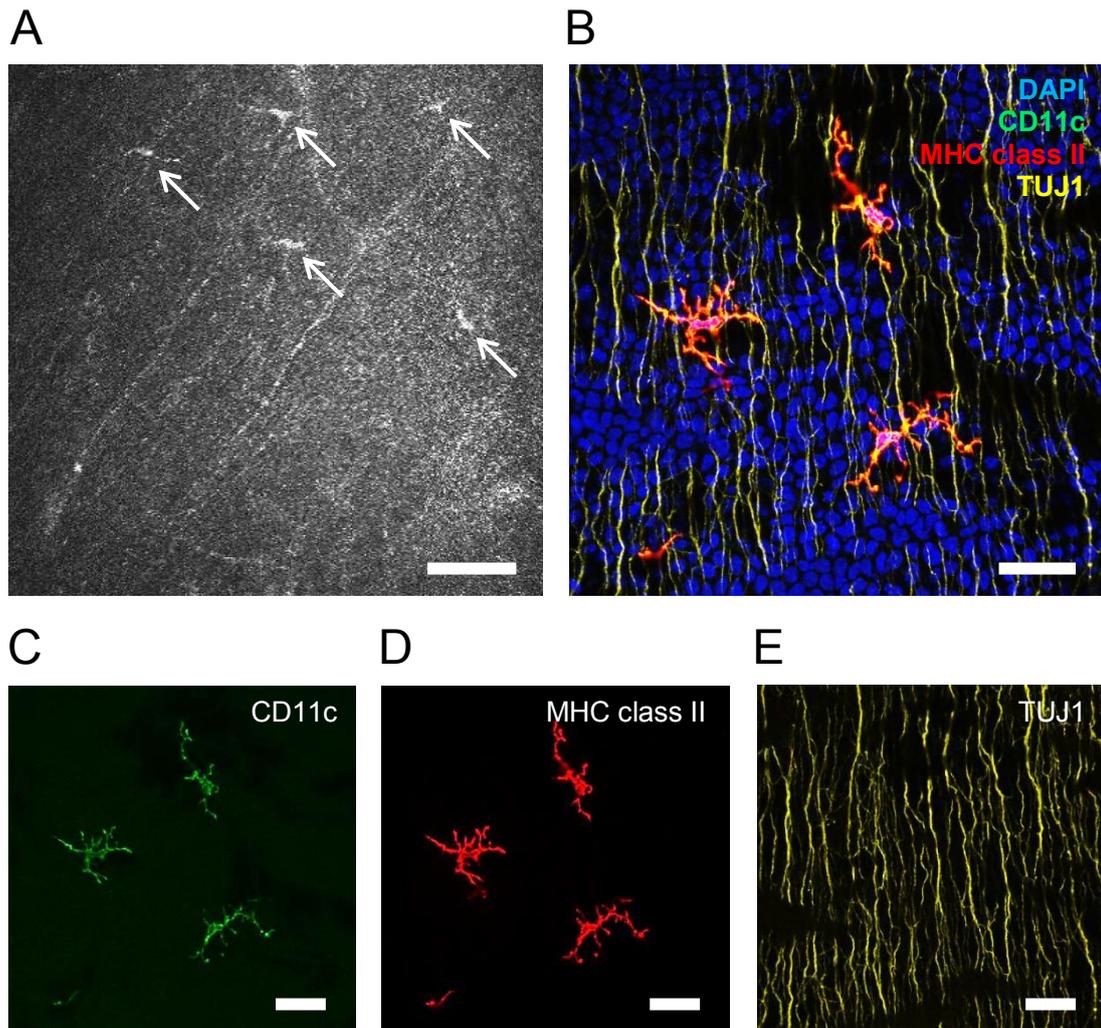
Unabhängig von der Behandlungsgruppe und dem Zeitpunkt der ersten bzw. neunten Woche konnte im Zentrum eines jeden cornealen Präparats das Vorhandensein CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> maturer DCs nachgewiesen werden. Dabei zeigten die normoglykämischen BALB/c-Mäuse in der neunten Woche ein vereinzelt Vorhandensein von CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs (Abb. 30 B, 30 C, 30 D) und eine gleichmäßig dichte und parallele Anordnung der class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup>

Nervenfasern des SNP (Abb. 30 B, 30 E), ähnlich wie in der ersten Woche. Im Vergleich dazu konnte in der neunten Woche bei den hyperglykämien BALB/c-Mäusen eine deutliche Zunahme der CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs (Abb. 31 B, 31 C, 31 D) und eine geringere Dichte der parallel angeordneten class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> Nervenfasern des SNP (Abb. 31 B, 31 E) im Vergleich zu den NaCl-behandelten BALB/c-Mäusen in der neunten Woche und den STZ-behandelten Mäusen in der ersten Woche verzeichnet werden. Die corneal whole mounts der ob/+ -Mäuse zeigten eine basal höhere Dichte von CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs (Abb. 32 B, 32 C, 32 D) sowie ein geringeres Vorhandensein der class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> Nervenfasern des SNP (Abb. 32 B, 32 E) gegenüber den NaCl-behandelten BALB/c-Mäusen. Im Gegensatz dazu präsentierten sich die corneal whole mounts von ob/ob-Mäusen in der neunten Woche mit einem auffällig dichtem Vorhandensein CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs (Abb. 33 B, 33 C, 33 D) im Vergleich zu den ob/+ -Mäusen zum selben Zeitpunkt. Die class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> Nervenfasern des SNP zeigten hingegen zu den Kontrolltieren keinen wesentlichen Unterschied (Abb. 33 B, 33 E).

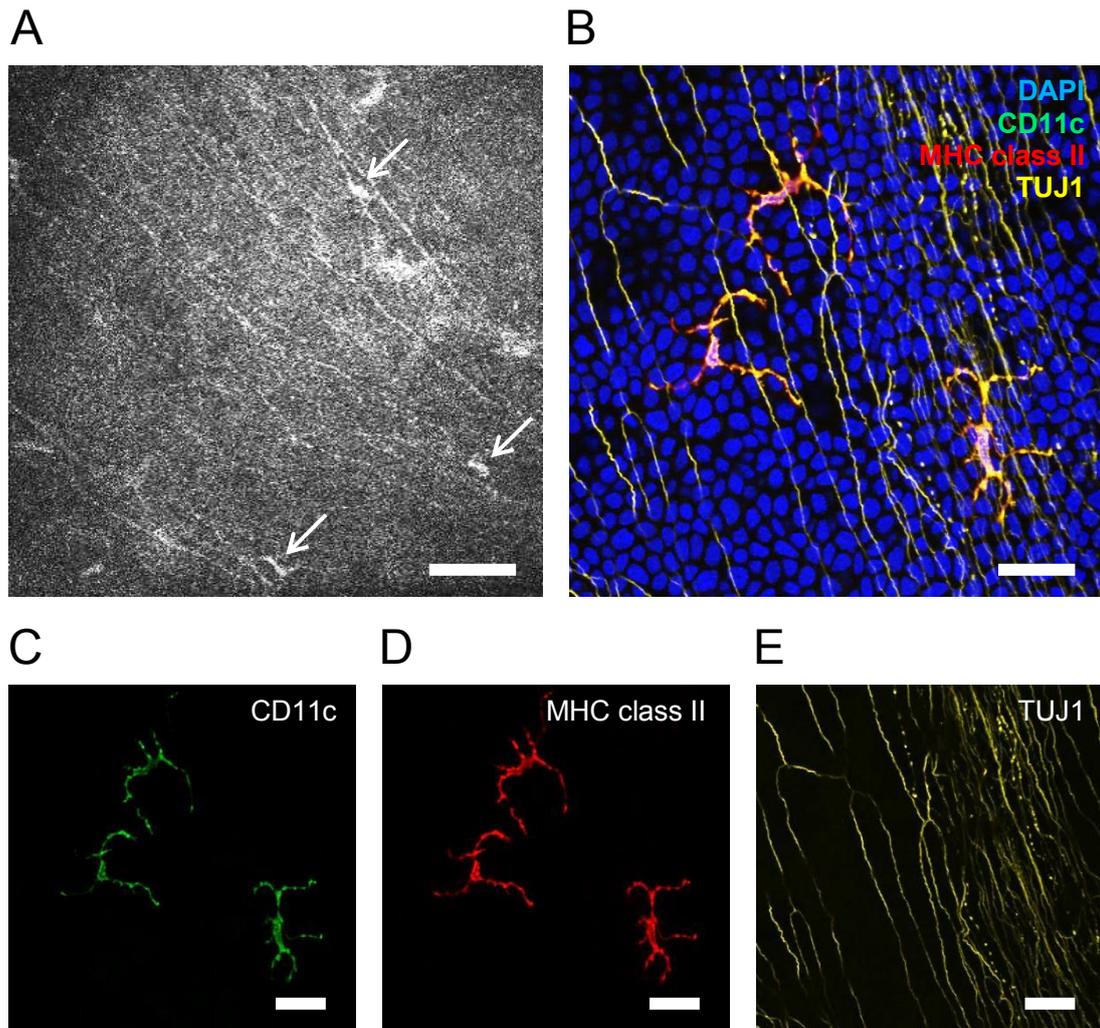
Die Mikroskopie eines exemplarischen corneal whole mounts einer normoglykämien BALB/c-Maus ermöglichte es eine morphologische Zell-Zell-Verbindung zwischen zwei benachbarten maturaen CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DCs zu beobachten (Abb. 34). Des Weiteren war es möglich, eine CD11c<sup>+</sup> und MHC II<sup>+</sup> DC im engen Netzwerk der class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> Nervenfasern des SNP darzustellen. Es ist offensichtlich, dass ein morphologischer Kontakt beider Zellen vorhanden ist (Abb. 35).



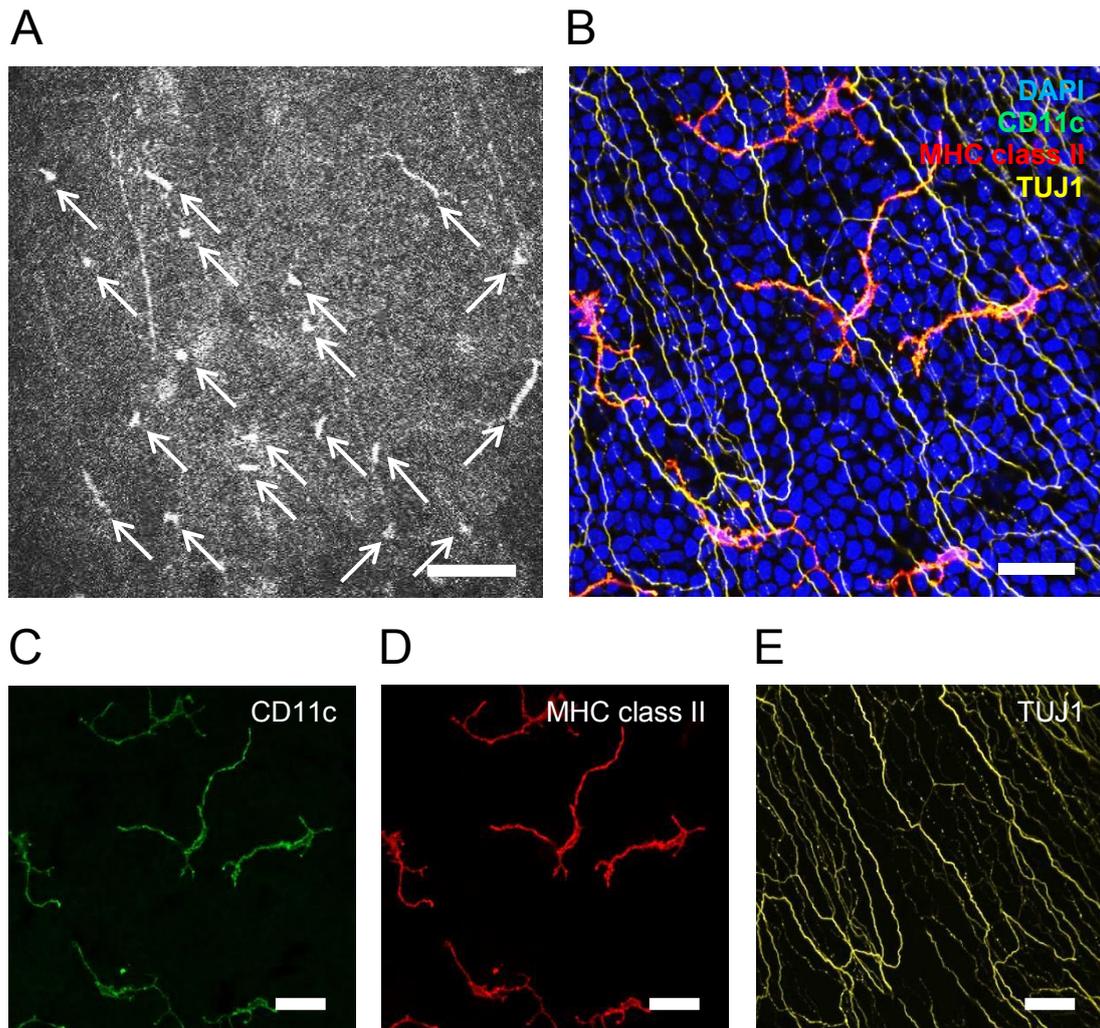
**Abb. 30** *In vivo* CCM und konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts normoglykämischer BALB/c-Mäuse zum Zeitpunkt der neunten Woche. **A:** *In vivo* CCM von Nervenfasern des SNP. Skala, 50  $\mu\text{m}$ . **B-E:** Konfokale Aufnahmen cornealer whole mounts mit einer  $\text{CD11c}^+$  (**B, C**, grün) und  $\text{MHC II}^+$  (**B, D**, rot) DC und class III  $\beta$ -Tubulin $^+$  (TUJ1) Nervenfasern des SNP (**B, E**, gelb). DAPI (blau) als Zellkernfärbung. Skala, 30  $\mu\text{m}$ .



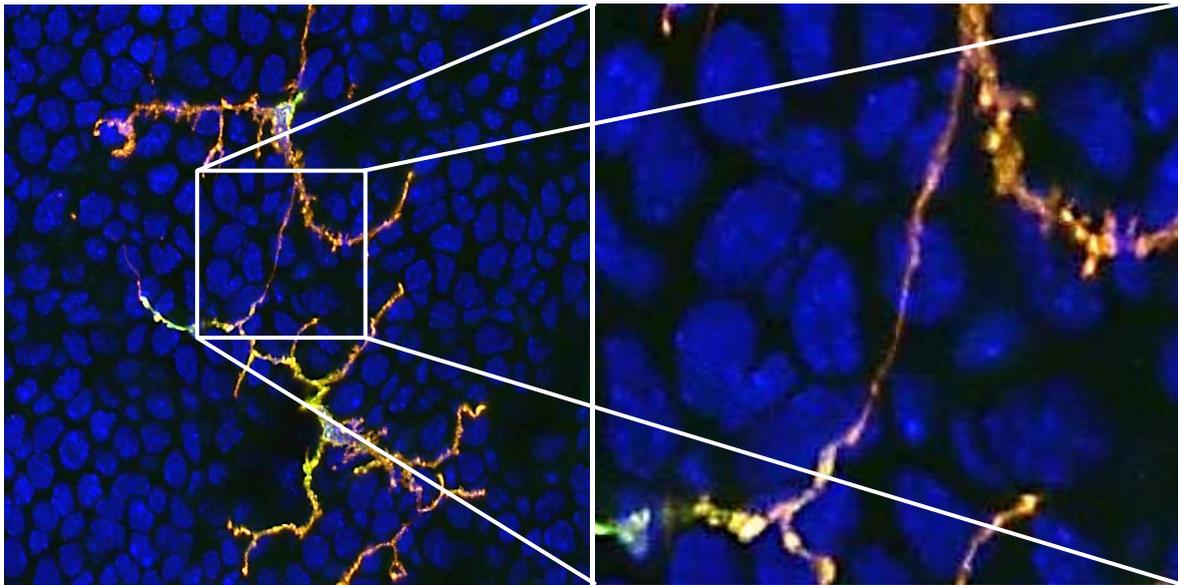
**Abb. 31** *In vivo* CCM und konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts hyperglykämischer BALB/c-Mäuse zum Zeitpunkt der neunten Woche. **A:** *In vivo* CCM von DCs und Nervenfasern des SNP. Skala, 50  $\mu\text{m}$ . **B-E:** Konfokale Aufnahmen cornealer whole mounts mit drei  $\text{CD11c}^+$  (**B, C**, grün) und  $\text{MHC II}^+$  (**B, D**, rot) DCs und class III  $\beta$ -Tubulin $^+$  (TUJ1) Nervenfasern des SNP (**B, E**, gelb). DAPI (blau) als Zellkernfärbung. Skala, 30  $\mu\text{m}$ .



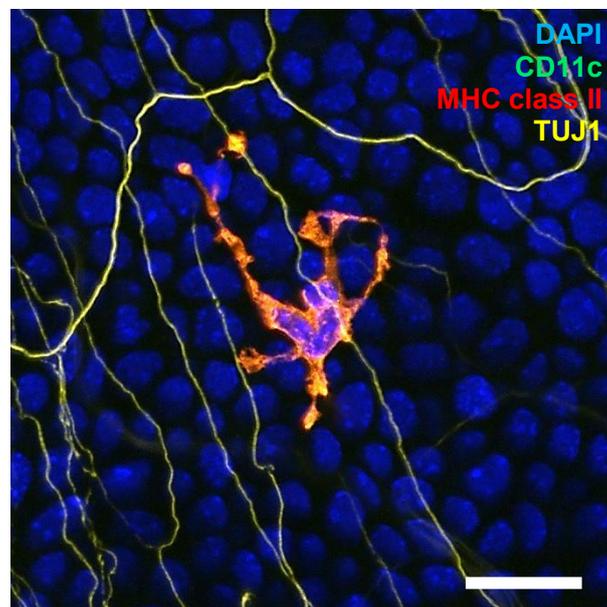
**Abb. 32** *In vivo* CCM und konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts normoglykämischer B6.VLep<sup>ob/+</sup>-Mäuse zum Zeitpunkt der neunten Woche. **A:** *In vivo* CCM von DCs und Nervenfasern des SNP. Skala, 50  $\mu\text{m}$ . **B-E:** Konfokale Aufnahmen cornealer whole mounts mit drei CD11c<sup>+</sup> (**B, C**, grün) und MHC II<sup>+</sup> (**B, D**, rot) DCs und class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> (TUJ1) Nervenfasern des SNP (**B, E**, gelb). DAPI (blau) als Zellkernfärbung. Skala, 30  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 33** *In vivo* CCM und konfokale Mikroskopie von corneal whole mounts hyperglykämischer B6.VLep<sup>ob/+</sup>-Mäuse zum Zeitpunkt der neunten Woche. **A:** *In vivo* CCM von DCs und Nervenfasern des SNP. Skala, 50  $\mu\text{m}$ . **B-E:** Konfokale Aufnahmen cornealer whole mounts mit mehreren CD11c<sup>+</sup> (**B, C**, grün) und MHC II<sup>+</sup> (**B, D**, rot) DCs und class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> (TUJ1) Nervenfasern des SNP (**B, E**, gelb). DAPI (blau) als Zellkernfärbung. Skala, 30  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 34** Konfokales Bild eines corneal whole mounts, welches eine morphologische Zell-Zell-Verbindung zwischen zwei murenen  $CD11c^+$  (grün) und  $MHC II^+$  (rot) DCs darstellt. DAPI (blau) als Zellkernfärbung.



**Abb. 35** Konfokales Bild eines corneal whole mounts in höherer Vergrößerung, welches die enge Lokalisation zwischen einer murenen DC und Nervenfasern des SNP darstellt.  $CD11c^+$  (grün) und  $MHC II^+$  (rot) DCs und class III  $\beta$ -Tubulin<sup>+</sup> (TUJ1) Nervenfasern des SNP (gelb). DAPI (blau) als Zellkernfärbung. Skala, 20  $\mu$ m.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 6.1.1 Diskussion der Tiermodelle

##### Modell des STZ-induzierten DM

STZ führt nach Applikation zu einer Inhibition der Insulinsekretion und verursacht somit einen Insulin-abhängigen DM bzw. DM I. STZ ist ein antimikrobielles Agens, welches erstmalig aus *Streptomyces achromogenes* isoliert wurde (Vavra et al., 1959) und bereits seinen Einsatz in der Tumorthherapie fand (Schein et al., 1967; Schein et al., 1974). STZ wirkt weiterhin diabetogen (Rakieten et al., 1963) auf Grund der zytotoxischen Spezifität gegenüber den Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Eine selektive Akkumulation von STZ in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen liegt darin begründet, dass dessen molekulare Struktur der von Glukose ähnelt und somit eine Aufnahme über den membranständigen GLUT2 der  $\beta$ -Zellen erfolgt (Elsner et al., 2000). Im Vergleich zu den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, Glukose mit erhöhter Aktivität aufzunehmen, sind Zellen, die den GLUT2 nicht exprimieren, gegenüber der Toxizität von STZ geschützt (Schnedl et al., 1994). Die Spezifität von STZ gegenüber den  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass bei STZ-behandelten Tieren Gewebeschäden in der Leber und der Niere auftreten, da bestimmte zelluläre Strukturen beider Organe ebenfalls GLUT2 exprimieren (Rerup, 1970). In den pankreatischen  $\beta$ -Zellen selbst führt STZ zur Zerstörung und anschließenden Fragmentation der DNA (Yamamoto et al., 1981), was als Hauptursache des  $\beta$ -Zell-Untergangs angesehen wird.

Neben dem STZ-induzierten DM-Modell wird die genetisch veränderte NOD (Non-Obese Diabetic)-Maus ebenfalls als DM I-Modell eingesetzt. Nach einer anfänglich spontanen Ausbildung einer Insulitis kommt es u. a. zu einer Infiltration von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  Lymphozyten sowie zur Rekrutierung von Autoantikörpern, was in einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas mündet (Yoon & Jun, 2001). Auf Grund der autoimmunen Prozesse, die die Entstehung des DM der NOD-Maus bestimmen, steht die Verwendung dieses

Mausstammes eher hinsichtlich der Entwicklung verschiedener Therapiestrategien zur Modulation dieser autoimmunen Vorgänge im Vordergrund.

Da das reproduzierbare Modell des chemisch induzierten DM I mittels STZ zu einer manifesten Hyperglykämie führt, kommt es der Nachbildung des menschlichen Krankheitsbild des DM I sehr nahe (Arison et al, 1967) und wird daher auch innerhalb tierexperimenteller Studien weit verbreitet eingesetzt. Die Anwendung des STZ-induzierten DM-Modells wird u. a. für die Untersuchung der diabetischen Neuropathie genutzt (Akkina et al., 2001; Christianson et al., 2003; Murakami et al., 2013) und erfüllt daher auch die Ansprüche dieser Arbeit.

#### Modell der B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Maus

Die Erfassung des komplexen Krankheitsbildes des DM II, einschließlich seiner Entstehung hinsichtlich genetischer Prädisposition und verschiedener Umweltfaktoren, wird unter Verwendung unterschiedlicher Tier- bzw. Mausmodelle versucht nachzubilden. Der in dieser Arbeit genutzte B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Mausstamm entwickelt einen spontanen DM II auf Grund einer Mutation im Leptin-Gen, welches für Leptin kodiert (Srinivasan & Ramarao, 2007). Dieses Hormon wird im weißen Fettgewebe produziert (Zhang et al., 1994) und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes. Da die Mutation des Leptin-Gens bei den obese-Mäusen zu einer Defizienz des Sättigungshormons Leptin führt, nehmen die Tiere auf Grund der Hyperphagie rasch an Körpergewicht zu und entwickeln somit ein Übergewicht. Zusätzlich zur Fettleibigkeit kommt die Ausbildung eines sog. Diabetes-like-Syndrom mit transienter Hyperglykämie, Glukoseintoleranz und Hyperinsulinämie hinzu (Srinivasan & Ramarao, 2007). Die obese-Maus findet in vielerlei Hinsicht Verwendung, wie beispielsweise zur Untersuchung metabolischer Veränderungen und Beeinträchtigungen des Immun- oder auch des kardiovaskulären Systems. Drel et al. verwendeten die Leptin-defiziente Maus zur Analyse der diabetischen Polyneuropathie und beobachteten u. a. eine Neuropathie kleiner

sensorischer Nervenfasern und ebenfalls eine starke Reduktion intraepidermaler Nervenfasern (Drel et al., 2006).

Auf Grund der Ausbildung eines milden DM II und der parallelen Entwicklung neurologischer Symptome wurde die B6.VLep<sup>ob/ob</sup>-Maus für diese Arbeit als optimales Tiermodell erachtet und fand entsprechend seine Verwendung in der Repräsentation des DM II.

### 6.1.2 Diskussion der *in vivo* CCM

Die vorliegende Studie setzt ihren Fokus auf die Evaluation zellulärer Strukturen der Cornea, wie die Nervenfasern des SNP und die DCs unter diabetischen Bedingungen und stützt sich daher hauptsächlich auf die Anwendung der *in vivo* CCM, die sich als nicht-invasive und repetitiv einsetzbare Methode auszeichnet. Auf Grund dieser Eigenschaften war die *in vivo* CCM hervorragend für die in dieser Arbeit durchgeführte Verlaufskontrolle muriner Corneas geeignet, die über einen Zeitraum von neun Wochen durchgeführt wurde. Malik et al. beurteilten die *in vivo* CCM ebenfalls als eine ideale Methode zur raschen Erfassung entsprechender Parameter zur Charakterisierung einer cornealen Neuropathie (Malik et al., 2003).

Durch die Aufnahme hochauflösender Bilder konnten der SNP und die DCs auf Grund ihrer durch den Laserstrahl angeregten Eigenreflektion präzise dargestellt und eindeutig identifiziert werden. In dieser Studie wurde ausschließlich das Zentrum einer jeweiligen Cornea für die Quantifizierung der Nervenfasern des SNP und der DCs mikroskopiert. Zum Auffinden der korrekten Lokalisation diente sowohl der Wirbel der Nervenfasern des SNP (siehe Punkt 4.4.3) als auch die Qualität der mikroskopierten Bilder. Zur Auswertung wurden ausschließlich plane Bilder mit eindeutig zu erkennender Zellmorphologie der Nervenfasern des SNP herangezogen und ihnen eine zentrale Lokalisation innerhalb der Cornea zugeschrieben. Aufnahmen, die bezüglich der Konvexität der Cornea außerhalb des Fokus lagen und keine klare Darstellung der cornealen Strukturen über das gesamte Gesichtsfeld ermöglichten, wurden somit als Bilder außerhalb des Zentrums definiert und folglich nicht in

die Auswertung mit einbezogen. Daher erfolgte an dieser Stelle bereits die Festlegung, dass Vorgänge, die sich möglicherweise im parazentralen bzw. peripheren Bereich der Cornea ereignen, nicht in diese Studie berücksichtigt wurden.

Hinsichtlich der Mikroskopie und der anschließenden Quantifizierung erfolgte die Fokussierung auf den SNP und nicht auf die Nerven des Stromas. Dies ist darin begründet, dass die Betrachtung des SNP den entscheidenden Vorteil der Analyse einzelner Nervenfasern ermöglicht. Dadurch kann eine exakte Quantifizierung der NFD erfolgen und morphologische Unterschiede zwischen den einzelnen Nervenfasern erkannt werden. Im Vergleich dazu erscheinen die stromalen Nerven, die als kompakte Nervenfaserbündel vorliegen, eher ungeeignet, da durch die enge Zusammenlagerung einzelner Nervenfasern deren differenzierte Einzelbetrachtung nicht möglich ist. Mit Untersuchung des SNP ist es möglich durch die Beurteilung einzelner Nervenfasern eine genaue Aussage über die DM-assozierte Polyneuropathie zu treffen, sowie auch einen Untergang cornealer Nervenfasern in einem frühen Stadium zu erfassen.

Diese Studie umfasst die Aufnahme und Auswertung neun verschiedener Bilder des cornealen Zentrums, während andere Arbeitsgruppen mit einer geringeren Bildanzahl arbeiteten (Patel et al., 2009; Reichard et al., 2014). Die hohe Anzahl von Aufnahmen hat zum Ziel, die zentrale Cornea möglichst repräsentativ bezüglich der Nervenfasern des SNP und der DCs zu erfassen.

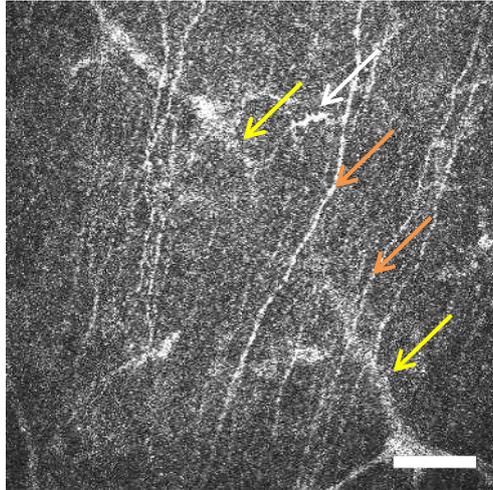
### **6.1.3 Diskussion der Off-Line Auswertung**

Die quantitative Off-Line Auswertung der insgesamt 18 Bilder vom Zentrum beider Corneas einer Maus wurde unter Verblindung des Experimentators durchgeführt.

Die Ermittlung der DCD konnte eindeutig anhand der Hyperreflektivität der Zellen und der Erkennung ihrer morphologischen Besonderheit, d. h. der Ausprägung von Zellausläufern, durchgeführt werden.

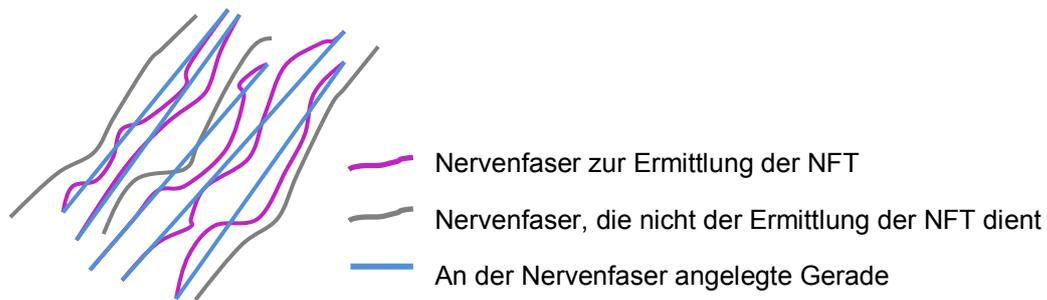
Die Ermittlung der NFD wurde durch die akkurate Aufnahme der einzelnen Bilder mittels der *in vivo* CCM ermöglicht, wobei über die anschließend angewendete Software ImageJ bzw. NeuronJ der Verlauf eines jeden einzelnen Nerven des SNP präzise nachvollzogen werden konnte. Die Aufsummierung der einzelnen Nervenfasernlängen bezogen auf die Fläche ergab den Parameter der NFD, anhand dessen ein mögliches Auftreten einer Polyneuropathie erfasst wurde. Bei Betrachtung der verschiedenen Bildaufnahmen fiel häufig ein Durchscheinen weniger stromaler Nerven des anterioren Stromas auf (Abb. 36). Wie bereits erwähnt, fanden diese in der Auswertung jedoch keine Berücksichtigung. Einige Arbeitsgruppen bedienten sich neben der Analyse der NFD zusätzlich dem Erfassen der Nervenfasernlänge und der Nervenfasernabzweigungen (Malik et al., 2003; Tavakoli et al., 2011b; Zhivov et al., 2013). Eine solche Unterteilung wurde in dieser Studie nicht vorgenommen, weil diese Parameter keine zusätzlichen Informationen hinsichtlich diabetischen Polyneuropathie erbringen. Nicht zuletzt erfasste der in dieser Studie bewusst gewählte Parameter der NFD bereits die Länge aller Nervenfasern inklusive deren Abzweigungen bezogen auf die Fläche.

Da die Nervenfasern des SNP zwar in einer Ebene parallel zur Oberfläche verlaufen, deren Richtung zum Teil jedoch im Mikrometerbereich variiert, ist die Beurteilung der Durchgängigkeit einer Nervenfasern nicht immer eindeutig möglich. Um dieser Limitation zu begegnen könnte durch die Anfertigung von z-stacks und deren Rekonstruktion (Allgeier et al., 2011) der Verlauf eines Nerven ohne Detailverluste exakt dargestellt werden. Die Aussagekraft des Parameters NFD wird dadurch allerdings in keinerlei Hinsicht gemindert, da die Quantifizierung einer relativ hohen Anzahl von neun Gesichtsfeldern pro Cornea standardisiert durchgeführt wurde.



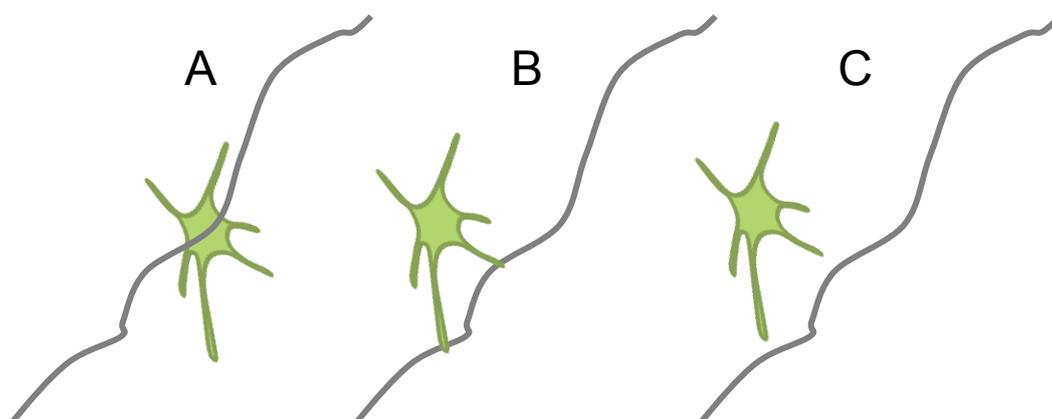
**Abb. 36** Exemplarische Darstellung eines Gesichtsfelds einer *in vivo* CCM Aufnahme des zentralen Anteils der Cornea einer normoglykämien BALB/c-Maus. Abgebildet ist eine DC (weißer Pfeil), Nervenfasern des SNP (orange Pfeile) und Nervenfaserbündel des anterioren Stromas (gelbe Pfeile) der Cornea. Skala, 50  $\mu\text{m}$ .

Die Ermittlung der NFT erfolgte anhand fünf verschiedener, randomisiert ausgewählter Nervenfasern pro Gesichtsfeld, deren Verlauf eindeutig nachvollziehbar war (Abb. 37). Nach der Ermittlung der Länge einer einzelnen Nervenfasern wurde dieser Wert der Länge einer an dem Nerven angelegten Gerade gegenübergestellt und der Quotient aus beiden Werten gebildet. Der Mittelwert aus der Summe der fünf errechneten Quotienten stellte den Grad der NFT dar. Laut Kallinikos et al. ist es ebenfalls möglich, den sog. Tortuositäts-Koeffizienten über ein komplexes mathematisches Paradigma zu errechnen (Kallinikos et al., 2004). Die in dieser Arbeit angewandte vereinfachte Errechnung der NFT beeinflusst die Aussagekraft dieses Parameters jedoch nicht.



**Abb. 37** Schematische Darstellung von Nervenfasern des SNP zur Illustration der Ermittlung der NFT in einem cornealen Gesichtsfeld. Die Gerade an den entsprechend fünf willkürlich ausgewählten Nervenfasern orientiert sich an dem Verlauf der zugehörigen Nervenfaser.

Zur Ermittlung der Ko-Lokalisation von DCs und Nervenfasern des SNP wurde ein jedes Gesichtsfeld der zentralen Cornea auf die Zahl der DCs, die in engem Kontakt mit einer oder mehrerer Nervenfasern des SNP stehen, in Relation zur Gesamtanzahl der DCs analysiert (Abb. 38). Da die Beurteilung der Ko-Lokalisation auf der Basis eines 2-dimensionalen Bildes erfolgt, ist die Aussagekraft dieses Parameters eingeschränkt. Eine 3-dimensionale Rekonstruktion der Aufnahme eines z-stacks würde durch das zusätzliche Einbeziehen einer weiteren Ebene die Beurteilung eines Zell-Zell-Kontaktes präzisieren.



**Abb. 38** Schematische Darstellung von DCs und Nervenfasern des SNP der zentralen Cornea. **A, B:** ko-lokalisierte DC an einer Nervenfaser des SNP. **C:** Nicht ko-lokalisierte DC an einer Nervenfaser des SNP.

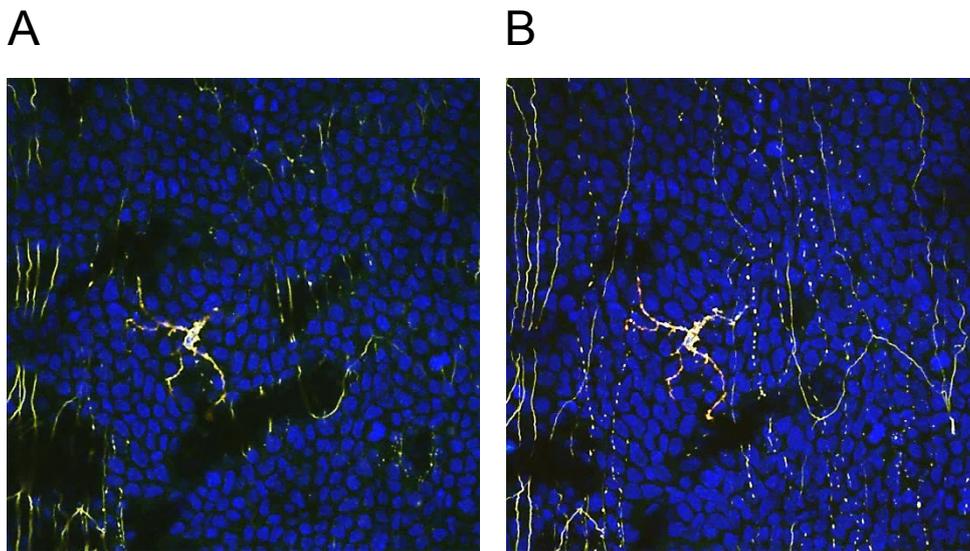
Die getroffene Auswahl der hier diskutierten Parameter schafft eine zuverlässige Basis, um der Zielstellung dieser Studie nachzugehen und einen möglichen Zusammenhang zwischen einer diabetischen Polyneuropathie und DCs als inflammatorische Komponente zu untersuchen.

#### 6.1.4 Diskussion der *in vitro* konfokalen Mikroskopie

Die Analyse von immunhistochemisch aufgearbeiteten corneal whole mounts konnte die Aussagekraft der *in vivo* CCM durch die Anwendung spezifischer Oberflächenmarker qualitativ unterstützen und erweitern. Während in der *in vivo* CCM eine Identifizierung der DCs lediglich über ihre typische dendritische Zellmorphologie möglich war, konnte durch den eingesetzten Antikörper anti-CD11c die DC eindeutig als solche identifiziert werden. Der Reifegrad bzw. der Aktivierungszustand einer DC wurde anhand der Färbung mittels des Antikörpers anti-MHC II erfasst. Ein erweiterter Einsatz von Antikörper, die gegen die kostimulatorischen Proteine CD80 bzw. CD86 gerichtet sind, hätte das Spektrum und somit die Beurteilung über den Aktivierungszustand einer DC weiterhin konkretisiert. Da die Expression des MHC II-Moleküls für eine vorangegangene Aufnahme und Prozessierung eines Antigens und somit für einen murenen Zustand der DC spricht, beschränkten wir uns auf das Vorhandensein des MHC II-Oberflächenantigens. Die Markierung der Nervenfasern des SNP mittels des Antikörpers anti-class III  $\beta$ -Tubulin erwies sich als äußerst zuverlässig und lies eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Nervenfasern zu.

Im Gegensatz zur *in vivo* CCM, bei der die Analyse der einzelnen Aufnahmen auf Grund des 2-dimensionalen Bildcharakters eingeschränkt ist, konnten die corneal whole mounts mittels der 3-dimensionalen Rekonstruktion mehrerer Bilder zu einem Gesamtbild den gesamten Verlauf der Nervenfasern des SNP erfassen. Gleiches galt auch für Zellausläufer der DCs, die die Ebene des SNP zum Teil verlassen, jedoch durch das Erstellen eines Bilderstapels als zugehöriger Anteil einer DC identifiziert werden konnten. Daher wurde die Aufnahme

eines z-stacks und dessen Rekonstruktion standardisiert bei der in vitro konfokalen Mikroskopie einer jeder Cornea angewendet (Abb. 39).



**Abb. 39** Konfokale Mikroskopie eines corneal whole mounts einer naiven BALB/c Maus. **A:** Aufnahme eines einzelnen Bildes in einer Ebene. **B:** 3-dimensionale Rekonstruktion eines z-stacks zu einem Gesamtbild.

Zusammenfassend wird auf der Grundlage der in dieser Studie festgelegten und untersuchten Parameter eine Vergleichbarkeit zu bestehenden Studien geschaffen. Des Weiteren umfasst diese Arbeit nicht nur die Betrachtung eines Ist-Zustandes, sondern erlaubt durch die repetitive Analyse über einen Zeitraum von insgesamt neun Wochen die Erfassung von Veränderungen über die Zeit.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

Die durch den DM veränderte Stoffwechsellage des Organismus findet sich, neben anderen Organsystemen bzw. Geweben, auch in den strukturellen und zellulären Kompartimenten der Cornea wieder.

### 6.2.1 Die Nervenfasern des SNP in der diabetischen Cornea

Klinische Studien berichten über den Verlust bzw. über morphologische Veränderungen von Nervenfasern sowohl im Epithel als auch im Stroma der Cornea diabetischer Patienten. Die neurologischen Symptome der diabetischen Cornea spiegeln sich u. a. in einer Abnahme der Nervenfasernlänge und -dichte des SNP wieder (Malik et al., 2003; Midena et al., 2006; Mocan et al., 2006; Tavakoli et al., 2010; Zhivov et al., 2013). Diese Beobachtung konnte durch die signifikante Abnahme der NFD in der fünften, siebten und neunten Woche in den STZ-behandelten BALB/c-Mäusen mit Ausprägung eines DM I bestätigt werden. Rosenberg et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen der eingeschränkten cornealen Sensitivität und der Dauer des DM, was wiederum parallel mit dem Schweregrad der Polyneuropathie einherging (Rosenberg et al., 2000). Da die Beeinträchtigung der NFD bei den hyperglykämischen STZ-Mäusen ab der fünften Woche auftrat und bis zur neunten Woche einen progressiven Verlauf zeigte, kann die Abhängigkeit der diabetischen Neuropathie von der Zeit bestätigt werden. Auf Grund dessen stellt der Zeitfaktor insofern eine enorm wichtige Größe dar, weil die Symptomatik der peripheren diabetischen Polyneuropathie relativ rasch voranschreitet und neurologische Veränderungen frühzeitig erkannt werden sollten. Dabei stellt, laut Quattrini et al., die *in vivo* CCM eine ideale diagnostische Methode zur Bestimmung solcher frühen Veränderungen neurologischer Strukturen in der diabetischen Cornea dar (Quattrini et al., 2007).

Die ob/ob-Mäuse zeigten bezüglich der NFD, im Vergleich zu den BALB/c-Mäusen, mit einer konstanten NFD über den gesamten Untersuchungszeitraum ein grundsätzlich anderes Bild. Im Vergleich zu den ob/+ -Mäusen befindet sich die NFD der ob/ob-Mäuse auf einer niedrigeren Ebene.

Die bei steigender BG signifikant geringer werdende NFD in DM I-Mäusen könnte mit der veränderten Stoffwechsellage des Tieres im Zusammenhang stehen. Diese Hypothese lässt sich durchaus auch auf das ob/ob-Mausmodell übertragen. Zwischen ob/ob- und ob/+ -Mäusen ergaben sich hingehend der NFD keine signifikanten Unterschiede. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass es ab der fünften Woche zu einem Anstieg der NFD in den

ob/ob-Mäusen kommt. Parallel dazu wurde bereits zum selben Zeitpunkt eine Abnahme der BG beobachtet, begründet in der einsetzenden Hyperinsulinämie. Dieser gegensätzliche Verlauf beider Parameter lässt sich möglicherweise als eine Verbesserung der neurologischen Symptomatik interpretieren, da mit der sinkenden BG eventuell auch die Überproduktion von Stoffwechselprodukten verringert wird.

Drel et al. nutzten vier Wochen alte Leptin-defiziente obese-Mäuse zur Evaluation der peripheren Neuropathie unter diabetischen Bedingungen und konnten eine Beeinträchtigung von Nervenfasern zeigen (Drel et al., 2006). Im Alter von 4 Wochen beginnt sich das komplexe Krankheitsbild des Mausstammes, mit einhergehender Erhöhung der BG, zu manifestieren. Tiere, die einen BG-Wert von mindestens 13,8 mmol/l aufwiesen, wurden als diabetisch eingestuft (Drel et al., 2006). Die von Drel et al. beschriebene auftretende Neuropathie bezieht sich somit auf die Phase der erhöhten BG und kann daher nur begrenzt auf die in dieser Studie verwendeten 8 - 12 Wochen alten ob/ob-Mäuse übertragen werden.

Der Parameter der NFT wurde in einigen Studien in die Beurteilung von Neuropathien mit einbezogen. So konnten Kallinikos et al. eine signifikant vermehrte Windung von Nervenfasern des SNP der Cornea mittels der *in vivo* CCM bei diabetischen Patienten mit schwerer Neuropathie beobachten (Kallinikos et al., 2004). Kawabuchi et al. untersuchten die Reinnervation der muskulären Endplatte nach induzierter Quetschung des N. ischiadicus und fanden heraus, dass dessen Regeneration mit vermehrter Tortuosität von Nervenfasern einherging, insbesondere bei älteren Tieren (Kawabuchi et al., 1998). Infolge dieser Beobachtungen wird eine vermehrte NFT als potentieller morphologischer Marker für die Regeneration von Nervenfasern angesehen. In dieser Studie konnten allerdings über den gesamten Untersuchungszeitraum keine signifikanten Veränderungen bzw. Tendenzen der NFT gezeigt werden. Möglicherweise erfolgte die Betrachtung der NFT in einem Zeitraum der milden bzw. moderaten Ausprägung der diabetischen Polyneuropathie, an dem das Ausmaß der Regeneration von Nervenfasern noch nicht erfasst werden konnte. Zur weiterführenden Untersuchung der NFT müssten die aktuell untersuchten Tiere mit

diabetischen Mäusen, die sich in einem späteren Stadium des DM befinden vergleichend analysiert werden.

### 6.2.2 DCs in der diabetischen Cornea

DCs konnten regelmäßig und unabhängig von der jeweiligen Behandlungsgruppe in der Cornea nachgewiesen werden. Knickelbein et al. untersuchten die Cornea auf das Vorhandensein von DCs unter Nutzung von Mäusen, die ein enhanced Green Fluorescence Protein (eGFP) ausgehend vom CD11c Promotor exprimieren (Knickelbein et al., 2009). So war es der Arbeitsgruppe möglich, bereits in naiven Corneas ausnahmslos eGFP<sup>+</sup> DCs mit typischer dendritischer Morphologie darzustellen. Die DCs wiesen dabei in der Peripherie und im parazentralen Bereich der Cornea einen höheren Anteil als im Zentrum auf (Knickelbein et al., 2009). Zudem war, im Gegensatz zu Beobachtungen von Hamrah et al. (2003b), die Lokalisation der Zellkörper von eGFP<sup>+</sup> DCs ausschließlich im Basalepithel der Cornea und nicht im Stroma vorzufinden. Deren Zellfortsätze waren hin zur Oberfläche der Cornea gerichtet (Knickelbein et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die immunhistochemische Aufarbeitung der corneal whole mounts ein abnehmender Gradient von DCs ausgehend von der Peripherie hingehend zum Zentrum naiver Corneas beobachtet werden. Unter diabetischen Bedingungen blieb dieser Gradient bestehen, zeigte allerdings eine stark erhöhte Anzahl der DCs sowohl in den STZ-behandelten als auch in den ob/ob-Mäusen. In Übereinstimmung mit Knickelbein et al. befanden sich die DCs ebenfalls in der Ebene des Basalepithels und streckten ihre Zellfortsätze zur Oberfläche der Cornea. Zhivov et al. berichteten ergänzend zu den *in vitro* Betrachtungen von Knickelbein et al. und dieser Studie, dass mittels der *in vivo* CCM in humanen Corneas innerhalb des Epithels in einer Tiefe von 35 - 60 µm LCs detektiert wurden und bei ungefähr 83 % der Probanden die Lokalisation von LCs auf Höhe der Basalzellen des cornealen Epithels auszumachen war (Zhivov et al., 2005).

Die quantitative Analyse der DCD der Cornea zeigte eine konstante Zunahme über den Zeitraum von neun Wochen in der STZ-behandelten Gruppe, während die ob/ob-Mäuse ein von Beginn an konstant hoch ausgeprägtes Level der DCD aufwiesen. Es zeigte sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der ansteigenden BG und der zunehmenden DCD der STZ-behandelten Gruppe, wobei die Regressionsanalyse der selbigen Parameter der ob/ob-Mäuse durch die signifikant negative Korrelation ein gegensätzliches Bild ergab.

Auf Grund dessen, dass die DCs im allgemeinen als „Wächter“ der Cornea angesehen werden und unter anderem für die Aufrechterhaltung der cornealen Homöostase über ihre Aufgabe der Antigenpräsentation fungieren, kann die mit steigender BG zunehmende Zahl DCs als Antwort auf in der Cornea stattfindende inflammatorische Prozesse verstanden werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Migration und Rekrutierung von DCs und LCs zum Verlust des Immunprivilegs führt, wie dies beispielsweise nach infektiösen Keratitiden der Fall ist (Asbell & Kamenar, 1987; Miller et al., 1993; Hazlett et al., 2002). Allein das Tragen von Kontaktlinsen kann in der Cornea zu einer starken Zunahme von LCs und somit zu einem veränderten immunologischen Status der humanen Cornea führen (Zhivov et al., 2007). Vergleichbar konnten Mastropasqua et al. erhebliche Unterschiede zwischen der Cornea im physiologischen, im nicht-immunogenen inflammatorischen und im immun-medierten inflammatorischen Zustand mittels *in vivo* CCM zeigen (Mastropasqua et al., 2006). So war die Dichte der DCs in inflammatorischen Corneas im Gegensatz zu physiologischen Corneas signifikant erhöht. Kein Unterschied in der DCD war jedoch zwischen der nicht-immunogenen inflammatorischen und der physiologischen Cornea zu finden (Mastropasqua et al., 2006). Die bei einer Entzündung vermehrte Rekrutierung von DCs in die Cornea ist somit ein Zeichen für ein immunologisches Ungleichgewicht des Gewebes. Dies könnte durchaus auch eine Erklärung für die erhöhte DCD der STZ-behandelten und ob/ob-diabetischen Tiere sein, da ein DM u. a. mit einer systemischen Inflammation einhergeht (Bending et al., 2012; Pickup & Mattock, 2003). Zudem weisen die ob/ob-Mäuse neben der

transient erhöhten BG einen gesteigerten inflammatorischen und veränderten immunologischen Status auf (Fantuzzi & Faggioni, 2000).

Die Region zwischen der Cornea und der Konjunktiva, die durch das Epithel beider Gewebe gebildet wird, ist dicht an APCs und wird als Limbus bezeichnet. Nach Setzung verschiedener Stimuli, wie sterile Latexbeads oder getötete Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, konnte ausgehend von der Peripherie eine zentripetale Infiltration von LCs in die zentrale Cornea beobachtet werden.

Ausgehend von der Peripherie konnte eine zentripetale Infiltration von LCs in die zentrale Cornea nach Setzung verschiedener Stimuli, wie sterile Latexbeads oder getötete Bakterien wie *Staphylococcus aureus* gezeigt werden (Niederkorn et al., 1989). Weitere experimentelle Studien, bei denen eine Anwendung des Kauters auf der cornealen Oberfläche (Yamagami et al., 2005) oder eine Platzierung konjunktivaler Nähte (Suzuki et al., 2000) als traditionelle Modelle zur Auslösung einer cornealen Inflammation genutzt wurden, konnten ebenfalls eine zentripetale Rekrutierung von DCs beobachten. Im Gegensatz dazu wird anderweitig auch eine mögliche Migration von LCs entlang der Nervenfasern des subepithelialen Nervenplexus beschrieben (Auran et al., 1995). Die Rekrutierung von DCs bzw. LCs unterliegt unterschiedlichen molekularen Mechanismen, wie beispielsweise der Sekretion von Interleukin-1 oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  durch apoptotische Zellen sowie der Sekretion des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktors (Dekaris et al., 1999; Cumberbatch et al., 1997; Heufler et al., 1988). Zusätzlich ist auch ein autokriner Mechanismus der Aktivierung durch die DC selbst denkbar (Rescigno & Borrow, 2001).

In dieser Studie wurden die zunehmende DCD und die abnehmende NFD gegenübergestellt. Dabei zeigten beide Parameter in den STZ-behandelten Mäusen eine signifikant negative Korrelation, was in der Manifestation der cornealen Neuropathie initial eine Rolle spielen könnte. Bereits Cruzat et al. konnten bei Patienten, die an einer infektiösen Keratitis litten, eine Abnahme der NFD des SNP feststellen (Cruzat et al., 2011). Popper et al. brachten die diabetische Neuropathie der Cornea mit einer Erhöhung sog. hoch reflektierender Zellen bei Patienten, die an einem DM II erkrankt waren, in Verbindung (Popper M, et al. IOVS

2005;46;ARVO E-Abstract 879). Diese Beobachtung wurde ebenfalls durch Tavakoli et al. in Patienten mit einem DM I oder DM II bestätigt und eine zusätzliche Korrelation beider Parameter gezeigt (Tavakoli et al., 2011a). Trotz des in dieser Arbeit dargestellten Zusammenhangs zwischen der zunehmenden DCD und der abnehmenden NFD zeigte die Ko-Lokalisation von DCs an Nervenfasern des SNP in allen Gruppen während des gesamten Untersuchungszeitraums keine Veränderung. Diese Beobachtung könnte zu der Vermutung führen, dass beide zellulären Prozesse zwar zeitlich parallel aber unabhängig von einander ablaufen.

### **6.2.3 Assoziation zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und Nervenfasern**

Mehrere *in vitro* Studien beschrieben bereits, dass Immunzellen höherer Organismen wie beispielsweise B-Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen und auch DCs in der Lage sind, untereinander tubuläre Verbindungen auszubilden (Onfelt et al., 2004; Watkins & Salter, 2005). Den sog. „membrane nanotubes“ (MNTs) wird die Funktion der interzellulären Kommunikation zugesprochen, da Zellen auf Grund einer solchen Verbindung in der Lage sind, den Transport unterschiedlicher Moleküle zu ermöglichen (Rustom et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte eine solche morphologische Besonderheit in der murinen Cornea nachgewiesen werden, welche sich als längliche Struktur zwischen zwei verschiedenen DCs präsentierte (Abb. 36). Chinnery et al. beschrieben die gelegentliche Beobachtung von MNTs zwischen MHC II<sup>+</sup> Zellen in inflammatorischen Corneas, die hauptsächlich im zentralen Bereich der Cornea im Vergleich zur Peripherie vorzufinden waren (Chinnery et al., 2008). Da die naive sowie auch die entzündete bzw. diabetische Cornea zentral eine geringere DCD im Vergleich zu den äußeren Regionen der Cornea aufweist und die Distanz zwischen den einzelnen DCs dementsprechend vergrößert ist, wäre die vermehrte und auch die Ausbildung längerer MNTs im Zentrum der Cornea eine mögliche Erklärung der zellulären Kommunikation. Im Gegensatz zur Sekretion von Mediatoren wie Zytokine, würden MNTs eine effektivere Verbindung zwischen cornealen DCs über lange Distanzen darstellen.

Neben der Ausbildung zellulärer Kontakte zwischen Zellen der gleichen Abstammung wäre ebenso eine Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise neurologischen und immunologischen Zellen, denkbar. Felten et al. beobachteten bereits noradrenerge Neurone innerhalb der Milz, die in engem Kontakt zu hämato- und lymphopoetischen Zellen standen, worauf hin ein durch immunomodulatorische Mediatoren veränderter Metabolismus der Nervenfasern vermutet wurde (Felten et al., 1987). Ma et al. untersuchten die Innervation und die Interaktion von Nerven- und Immunzellen im Darm, wobei u. a. in den Darmzotten des Dünndarms Membran-Membran Kontakte zwischen DCs und Nervenzellen beobachtet werden konnten, die eine synaptisch-ähnliche Morphologie aufwiesen (Ma et al., 2007). Ähnliche Kontakte konnten auch bei *in vitro* Experimenten zwischen Nerven- und Mastzellen demonstriert werden (Blennerhassett et al., 1991; Suzuki et al., 2004). Des Weiteren zeigte eine Untersuchung der Atemwege räumliche Assoziationen zwischen DCs und sensorischen Nervenfasern, die vermehrt bei einer allergischen Inflammation der Atemwege auftraten (Veres et al., 2007). Hosoi et al. berichteten über einen engen Kontakt zwischen Nervenfasern und LCs in der Epidermis des Menschen, der über die Freisetzung des Neuropeptids Calcitonin gene-related peptide die Antigenpräsentation der LCs verhinderte, somit funktionell aktiv war und wiederum einen möglichen Beweis für eine neuro-immunologische Kommunikation darstellt (Hosoi et al., 1993). Solche zellulären Vorgänge wären ebenfalls in der diabetischen Cornea zwischen den Nervenfasern und den DCs denkbar. So könnte die Formation zellulärer Ausläufer ausgehend von DCs zu einer Beeinträchtigung der Nervenfasern des SNP und folglich zu einer cornealen Polyneuropathie führen.

In einer aktuell publizierten Studie, wurde die mögliche neuroimmunologische Interaktion im Stroma der physiologischen murinen Cornea untersucht (Seyed-Razavi et al, 2014). Die Arbeitsgruppe konnte einen morphologischen Zusammenhang zwischen Nerven und Immunzellen beobachten, der am häufigsten in der Peripherie, im Gegensatz zum Zentrum und zur parazentralen Region, der Cornea auftrat. Jene immunologischen Zellen stellten zu einem geringen Anteil DCs und größtenteils Makrophagen dar.

Diese Beobachtungen in den unterschiedlichen Organen bzw. Geweben lassen vermuten, dass Nerven- und Immunzellen auch in der Cornea in der Lage sind, durch die Formation einer neuroimmunologischen Synapse (Tournier & Hellmann, 2003) eine anatomische Basis für eine bidirektionale Kommunikation zu bilden, um daraufhin neuroimmunologische Vorgänge hervorzurufen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie wurde zur Evaluation eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Untergang von Nervenfasern des SNP und der Rekrutierung bzw. Infiltration von DCs in die Cornea unter diabetischen Bedingungen durchgeführt. Sie umfasst die Untersuchung der Cornea über einen Zeitraum von neun Wochen unter Verwendung zwei verschiedener Tiermodelle, welche die Nachahmung eines DM I bzw. DM II verkörpern. Die Ergebnisse stützen sich dabei maßgeblich auf die *in vivo* CCM, anhand dessen die Quantifizierung der DCD, NFD, NFT und Ko-Lokalisation von DCs und Nervenfasern des SNP erfolgte. Darüber hinaus wurde zusätzlich über die Analyse von corneal whole mounts mittels der konfokalen Mikroskopie die Möglichkeit geschaffen, die zellulären Strukturen qualitativ über die Verwendung spezifischer Oberflächenmarker zu bewerten.

Die vorliegenden Ergebnisse und die anschließende Diskussion führten zu den folgenden Schlussfolgerungen:

- (1) Der erhöhte BG-Spiegel zeigte eine signifikant positive Korrelation mit der Zunahme der DCD bei STZ-behandelten BALB/c-Mäusen. In ob/ob-Mäusen konnte eine signifikant negative Korrelation beider Parameter beobachtet werden.
- (2) Die DCD zeigte bei STZ-behandelten BALB/c-Mäusen über den gesamten Versuchszeitraum einen konstanten Anstieg, im Gegensatz zu den ob/ob-Mäusen, die bereits ein initial höheres Level der DCD aufwiesen.

- (3) In STZ-behandelten BALB/c-Mäusen zeigte die Regressionsanalyse der DCD und der NFD eine signifikant negative Korrelation. Diese Beobachtung konnte in ob/ob-Mäusen nicht bestätigt werden.
- (4) Die NFT blieb sowohl in den STZ-behandelten BALB/c-Mäusen als auch in den ob/ob-Mäusen über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant.
- (5) Die Ko-Lokalisation von DCs und Nervenfasern des SNP zeigte keine Veränderungen über den gesamten Versuchszeitraum.

Die aktuelle Studie konnte angesichts der erhobenen Parameter einen Zusammenhang zwischen dem Untergang cornealer Nervenfasern und einer Zunahme von DCs unter diabetischen Bedingungen darstellen. Es wird vermutet, dass die durch erhöhte BG-Werte veränderte Stoffwechsellage des Tieres über die Rekrutierung von DCs in die Cornea einen Zustand der Inflammation hervorruft. Innerhalb dessen könnte eine Interaktion zwischen Nervenzellen und DCs über lösliche Substanzen wie Zytokine oder die Ausbildung von MNTs zur diabetischen cornealen Polyneuropathie führen. Um dieser Hypothese nachzugehen, würde die Erweiterung der Studie mittels der Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen zwischen Nervenfasern und DCs Aufschluss über eine funktionelle Assoziation beider Zelltypen in der diabetischen Cornea geben.

## 8 SUMMARY

### **Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the murine cornea**

The current study was conducted to evaluate a possible relationship between a loss of nerve fibers of the SNP and the recruitment or infiltration of DCs in the diabetic cornea. It includes the analysis of the cornea over a period of nine weeks by the use of two different animal models presenting DM I and DM II. The results measured by quantification of the DCD, NFD, NFT and Co-Localization of DCs and nerve fibers of the SNP are mainly based on the *in vivo* CCM. To investigate the cellular structures in a qualitative manner, we used specific cell surface markers and analyzed the prepared corneal whole mounts with confocal microscopy. The results and the subsequent discussion led to the following conclusion:

- (1) Regression analysis showed a significant positive correlation of the increased BG-level and the increased DCD in STZ-treated BALB/c mice. In ob/ob mice there was a significant negative correlation between both parameters.
- (2) The DCD of STZ-treated BALB/c mice showed a gradual increase over the period of one to nine weeks in contrast to the ob/ob mice with a nearly constant high level of DCD.
- (3) Regression analysis of DCD and NFD showed a significant negative correlation in of STZ-treated BALB/c mice. This observation could not be confirmed in ob/ob mice.
- (4) The NFT in STZ-treated BALB/c and ob/ob mice showed a relative constant level over the whole period of nine weeks.
- (5) The Co-Localization of DCs and nerve fibers of the SNP did not show any differences over the whole period of nine weeks.

The current study was able to show a relation between the loss of corneal nerve fibers and the increase of DCs under diabetic conditions. We suppose that a high BG-level and the related metabolic changes lead to a recruitment of DCs into the cornea and consequently to inflammation. Due to an interaction between nerve fibers and DCs soluble factors like cytokines or the formation of MNTs could lead to corneal polyneuropathy. To verify this assumption, cellular and molecular mechanisms between nerve fibers and DCs have to be analyzed to provide information on a functional association of both cell types in the diabetic cornea.

## 9 REFERENZEN

1. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67:3-21.
2. Akkina SK, Patterson CL, Wright DE. GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice. *Exp Neurol.* 2001;167:173-82.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002. T Cells and MHC Proteins. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26926/>
4. Allgeier S, Zhivov A, Eberle F, Koehler B, Maier S, Bretthauer G, Guthoff RF, Stachs O. Image reconstruction of the subbasal nerve plexus with in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5022-8.
5. Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes.* 1967;16:51-6.
6. Asbell PA, Kamenar T. The response of Langerhans cells in the cornea to herpetic keratitis. *Curr Eye Res.* 1987;6:179-82.
7. Atkin SL, Coady AM, Horton D, Sutaria N, Sellars L, Walton C. Multiple cerebral haematomata and peripheral nerve palsies associated with a case of juvenile diabetic ketoacidosis. *Diabet Med.* 1995;12:267-70.
8. Auran JD, Koester CJ, Kleiman NJ, Rapaport R, Bomann JS, Wirotko BM, Florakis GJ, Koniarek JP. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology.* 1995;102:33-41.
9. Azartash K, Kwan J, Paugh JR, Nguyen AL, Jester JV, Gratton E. Pre-corneal tear film thickness in humans measured with a novel technique. *Mol Vis.* 2011;17:756-67.
10. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-52.
11. Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res.* 2004;63:582-92. Review.
12. Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature.* 2001;414:788-91. Review.

13. Bending D, Zaccone P, Cooke A. Inflammation and type one diabetes. *Int Immunol*. 2012;24:339-346.
14. Blennerhassett MG, Tomioka M, Bienenstock J. Formation of contacts between mast cells and sympathetic neurons in vitro. *Cell Tissue Res*. 1991;265:121-8.
15. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011;18:139-43. Review.
16. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D; American Diabetes Association. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005;28:956-62.
17. Britland ST, Young RJ, Sharma AK, Clarke BF. Association of painful and painless diabetic polyneuropathy with different patterns of nerve fiber degeneration and regeneration. *Diabetes*. 1990;39:898-908.
18. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurol*. 2012;11:521-34.
19. Chhabra M, Prausnitz JM, Radke CJ. Modeling corneal metabolism and oxygen transport during contact lens wear. *Optom Vis Sci*. 2009;86:454-66.
20. Chinnery HR, Pearlman E, McMenamin PG. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *J Immunol*. 2008;180:5779-83.
21. Christianson JA, Ryals JM, McCarson KE, Wright DE. Beneficial actions of neurotrophin treatment on diabetes-induced hypoalgesia in mice. *J Pain*. 2003;4:493-504.
22. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:233-6.
23. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L, Haanpaa M, Jensen TS, Serra J, Treede RD. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. *Eur J Neurol*. 2010;17:1010-8.
24. Cruzat A, Witkin D, Baniasadi N, Zheng L, Ciolino JB, Jurkunas UV, Chodosh J, Pavan-Langston D, Dana R, Hamrah P. Inflammation and the nervous system: the connection in the cornea in patients with infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:5136-43.

25. Cumberbatch M, Dearman RJ, and Kimber I. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology*. 1997;92:388–395.
26. Cunha-Vaz J, Ribeiro L, Lobo C. Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2014. pii: S1350-9462. Review.
27. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 1992;15:318-68.
28. Dekaris I, Zhu SN, Dana MR. TNF-alpha regulates corneal Langerhans cell migration. *J Immunol*. 1999;162:4235-9.
29. Deli G, Bosnyak E, Pusch G, Komoly S, Feher G. Diabetic neuropathies: diagnosis and management. *Neuroendocrinology*. 2013;98:267-80.
30. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 2000;130:963-74.
31. Dohlman CH. The function of the corneal epithelium in health and disease. The Jonas S. Friedenwald Memorial Lecture. *Invest Ophthalmol*. 1971;10:383-407.
32. Drel VR, Mashtalir N, Ilnytska O, Shin J, Li F, Lyzogubov VV, Obrosova IG. The leptin-deficient (*ob/ob*) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. *Diabetes*. 2006;55:3335-43.
33. Dvorscak L, Marfurt CF. Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:910-6.
34. Dyck PJ, Davies JL, Wilson DM, Service FJ, Melton LJ 3rd, O'Brien PC. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Diabetes Care*. 1999;22:1479-86.
35. Dyck PJ, Zimmerman BR, Vilen TH, Minnerath SR, Karnes JL, Yao JK, Poduslo JF. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 1988;319:542-8.
36. Eckard A, Stave J, Guthoff RF. In vivo investigations of the corneal epithelium with the confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM). *Cornea*. 2006;25:127-31.
37. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43:1528-33.

38. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26 Suppl 1:S5-20.
39. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000;68:437-46.
40. Farjo AA, McDermott ML, Soong HK. Corneal anatomy, physiology, and wound healing. In: Yanoff M, Duker JS, eds. *Ophthalmology*, 3rd edn. Edinburgh, Mosby Elsevier: Elsevier Inc., 2009;203-8.
41. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA, Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev*. 1987;100:225-60.
42. Ferrari G, Nalassamy N, Downs H, Dana R, Oaklander AL. Corneal innervation as a window to peripheral neuropathies. *Exp Eye Res*. 2013;113:148-50.
43. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond)*. 1997;11:465-71.
44. Gepts W, Christophe J, Mayer J. Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide. *Diabetes*. 1960;9:63-9.
45. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest*. 1994;94:110-7.
46. Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect*. 1999;1:1079-84.
47. Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. *Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006.
48. Guthoff RF, Wiens H, Hahnel C, Wree A. Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*. 2005;24:608-13.
49. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2009;37:100-17.
50. Hamrah P, Huq SO, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. Corneal immunity is mediated by heterogeneous population of antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol*. 2003a;74:172-8.

51. Hamrah P, Zhang Q, Liu Y, Dana MR. Novel characterization of MHC class II-negative population of resident corneal Langerhans cell-type dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:639-46.
52. Hamrah P, Liu Y, Zhang Q, Dana MR. The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003b;44:581-9.
53. Hartemann A, Attal N, Bouhassira D, Dumont I, Gin H, Jeanne S, Said G, Richard JL; Working Group on the Diabetic Foot from the French-speaking Society of Diabetology. Painful diabetic neuropathy: diagnosis and management. *Diabetes Metab.* 2011;37:377-88.
54. Hazlett LD, McClellan SA, Rudner XL, Barrett RP. The role of Langerhans cells in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:189-97.
55. Herrmann DN, Griffin JW, Hauer P, Cornblath DR, McArthur JC. Epidermal nerve fiber density and sural nerve morphometry in peripheral neuropathies. *Neurology.* 1999;53:1634-40.
56. Heufler C, Koch F, Schuler G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 1988;167:700-5.
57. Hoffmann EM, Lamparter J, Schmidt T, Schulze A. [Glaucoma diagnosis and follow-up using the Heidelberg Retina Tomograph]. *Ophthalmologe.* 2009;106:687-8, 690-5.
58. Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol.* 1977;22:69-87.
59. Hori J. Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *J Ocul Biol Dis Infor.* 2008;1: 94-100.
60. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature.* 1993;363:159-63.
61. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med.* 2000;342:301-7.
62. International Diabetes Federation. (2014). Available online: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
63. Jansson L, Hellerström C. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol.* 1986;251:E644-7.

64. Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int.* 2008;74:22-36. Review.
65. John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond).* 1993;7:230-7.
66. Jolles S. Paul Langerhans. *J Clin Pathol.* 2002;55:243.
67. Jun AS, Chakravarti S, Edelhauser HF, Kimos M. Aging changes of mouse corneal endothelium and Descemet's membrane. *Exp Eye Res.* 2006;83:890-6.
68. Kahn SE. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4047-58.
69. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:418-22.
70. Kaplan HJ. Anatomy and function of the eye. *Chem Immunol Allergy.* 2007;92:4-10.
71. Kawabuchi M, Chongjian Z, Islam AT, Hirata K, Nada O. The effect of aging on the morphological nerve changes during muscle reinnervation after nerve crush. *Restor Neurol Neurosci.* 1998;13:117-27.
72. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2010;3:156-66.
73. Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 2002;45:1475-83.
74. Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, Birkeland KI, Berg TJ, Thornalley PJ, Brownlee M, Hanssen KF. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2003;52:163-7.
75. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol.* 2012;166:877-94.
76. King R H M. The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy. *Mol Pathol.* 2001;54:400-408.
77. Klein R, Moss SE, Klein BE. Is gross proteinuria a risk factor for the incidence of proliferative diabetic retinopathy? *Ophthalmology.* 1993;100:1140-6.
78. Knickelbein JE, Watkins SC, McMennamin PG, Hendricks RL. Stratification of Antigen-presenting Cells within the Normal Cornea. *Ophthalmol Eye Dis.* 2009;1:45-54.

79. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 1868;44:325-337.
80. Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, Rosenberg N, Sommer C; European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol.* 2005;12:747-58.
81. Lauria G, Devigili G. Skin biopsy as a diagnostic tool in peripheral neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3:546-57.
82. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science.* 1976;193:415-7.
83. Løseth S, Stålberg E, Jorde R, Mellgren SI. Early diabetic neuropathy: thermal thresholds and intraepidermal nerve fibre density in patients with normal nerve conduction studies. *J Neurol.* 2008;255:1197-202.
84. Ma B, von Wasielowski R, Lindenmaier W, Dittmar KE. Immunohistochemical study of the blood and lymphatic vasculature and the innervation of mouse gut and gut-associated lymphoid tissue. *Anat Histol Embryol.* 2007;36:62-74.
85. Malik RA. The pathology of human diabetic neuropathy. *Diabetes.* 1997;46 Suppl 2:S50-3.
86. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie CH, Morgan P, Efron N, Boulton AJ. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia.* 2003;46:683-8.
87. Malik RA, Veves A, Walker D, Siddique I, Lye RH, Schady W, Boulton AJ. Sural nerve fibre pathology in diabetic patients with mild neuropathy: relationship to pain, quantitative sensory testing and peripheral nerve electrophysiology. *Acta Neuropathol.* 2001;101:367-74.
88. Marfurt CF, Ellis LC. Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *J Comp Neurol.* 1993;336:517-31.
89. Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, Di Nicola M, Dua HS. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol.* 2006;142:736-44.
90. Mathiesen ER, Rønn B, Storm B, Foght H, Deckert T. The natural course of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes: a 10-year prospective study. *Diabet Med.* 1995;12:482-7.

91. Midea E, Brugin E, Ghirlando A, Somavilla M, Avogaro A. Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study. *J Refract Surg.* 2006;22:1047-52.
92. Miller JK, Laycock KA, Nash MM, Pepose JS. Corneal Langerhans cell dynamics after herpes simplex virus reactivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34:2282-90.
93. Mocan MC, Durukan I, Irkec M, Orhan M. Morphologic alterations of both the stromal and subbasal nerves in the corneas of patients with diabetes. *Cornea.* 2006;25:769-73.
94. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea.* 1998;17:485-92.
95. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76:521-42.
96. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:476-88.
97. Murakami T, Iwanaga T, Ogawa Y, Fujita Y, Sato E, Yoshitomi H, Sunada Y, Nakamura A. Development of sensory neuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Brain Behav.* 2013;3:35-41.
98. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 1995;18:1160-7.
99. Niederkorn JY. The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation.* 1999;67:1503-8.
100. Niederkorn JY, Peeler JS, Mellon J. Phagocytosis of particulate antigens by corneal epithelial cells stimulates interleukin-1 secretion and migration of Langerhans cells into the central cornea. *Reg Immunol.* 1989;2:83-90.
101. O'Leary DJ, Wilson G, Bergmanson J. The influence of calcium in the tear-side perfusate on desquamation from the rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res.* 1985;4:729-31.
102. Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol.* 2004;173:1511-3.
103. Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4485-8.

104. Patel DV, Tavakoli M, Craig JP, Efron N, McGhee CN. Corneal sensitivity and slit scanning in vivo confocal microscopy of the subbasal nerve plexus of the normal central and peripheral human cornea. *Cornea*. 2009;28:735-40.
105. Paul F, Amit I. Plasticity in the transcriptional and epigenetic circuits regulating dendritic cell lineage specification and function. *Curr Opin Immunol*. 2014;30:1-8.
106. Peyrot M, Rubin RR. Levels and risks of depression and anxiety symptomatology among diabetic adults. *Diabetes Care*. 1997;20:585-90.
107. Pickup JC, Mattock MB. Activation of the innate immune system as a predictor of cardiovascular mortality in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2003;20:723-6.
108. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, Marshall A, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2007;56:2148-54.
109. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep*. 1963;29:91-8.
110. Reichard M, Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. In vivo visualisation of murine corneal nerve fibre regeneration in response to ciliary neurotrophic factor. *Exp Eye Res*. 2014;120:20-7.
111. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:617-28.
112. Reichard M, Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O. In vivo visualisation of murine corneal nerve fibre regeneration in response to ciliary neurotrophic factor. *Exp Eye Res*. 2014;120:20-7.
113. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer-Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, Guthoff R, Stachs O. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res*. 2010;35:1072-80.
114. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;22:485-518.
115. Rescigno M, Borrow P. The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell*. 2001;106:267-70.

116. Ribu L, Hanestad BR, Moum T, Birkeland K, Rustoen T. A comparison of the health-related quality of life in patients with diabetic foot ulcers, with a diabetes group and a nondiabetes group from the general population. *Qual Life Res.* 2007;16:179-89.
117. Rorsman P, Braun M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:155-79. Review.
118. Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ, Müller LJ, Grönhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2915-21.
119. Rubin RR, Peyrot M. Quality of life and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999;15:205-18.
120. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004;303:1007-10.
121. Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3:331-40.
122. Saini KS, Thompson C, Winterford CM, Walker NI, Cameron DP. Streptozotocin at low doses induces apoptosis and at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line, INS-1. *Biochem Mol Biol Int.* 1996;39:1229-36.
123. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 1995;182:389-400.
124. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H. Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 1998;41:1355-60.
125. Schalkwijk CG, Ligtvoet N, Twaalfhoven H, Jager A, Blaauwgeers HG, Schlingemann RO, Tarnow L, Parving HH, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW. Amadori albumin in type 1 diabetic patients: correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries. *Diabetes.* 1999;48:2446-53.
126. Schein PS, Cooney DA, Vernon ML. The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. *Cancer Res.* 1967;27:2324-32.
127. Schein PS, O'Connell MJ, Blom J, Hubbard S, Magrath IT, Bergevin P, Wiernik PH, Ziegler JL, DeVita VT. Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998). *Cancer.* 1974;34:993-1000.

128. Schimmelpfennig B. Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1982;218:14-20.
129. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 1994;43:1326-33.
130. Seyed-Razavi Y, Chinnery HR, McMenemy PG. A novel association between resident tissue macrophages and nerves in the peripheral stroma of the murine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:1313-20.
131. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007;125:451-72.
132. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993;16:434-44.
133. Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R. [Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures]. *Ophthalmologe.* 2002;99:276-80.
134. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137:1142-62.
135. Streilein JW. Anterior chamber associated immune deviation: the privilege of immunity in the eye. *Surv Ophthalmol.* 1990;35:67-73.
136. Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, Cornblath DR, Polydefkis M. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology.* 2003;60:108-11.
137. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Daugas E, Wang HG, Geley S, Fassy F, Reed JC, Kroemer G. The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1997;186:25-37.
138. Suzuki T, Sano Y, Kinoshita S. Conjunctival inflammation induces Langerhans cell migration into the cornea. *Curr Eye Res.* 2000;21:550-3.
139. Suzuki A, Suzuki R, Furuno T, Teshima R, Nakanishi M. N-cadherin plays a role in the synapse-like structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull.* 2004;27:1891-4.

140. Tavakoli M, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Increased Langerhan cell density and corneal nerve damage in diabetic patients: role of immune mechanisms in human diabetic neuropathy. *Cont Lens Anterior Eye*. 2011a;34:7-11.
141. Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. *Clin Ophthalmol*. 2008;2:435-45.
142. Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, Herbert A, Fadavi H, Efron N, Boulton AJ, A Malik R. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Diabet Med*. 2011b;28:1261-7.
143. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, Morgan P, Efron N, Boulton AJ, Malik RA. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2010;33:1792-7.
144. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329:977-86.
145. Tomii S, Kinoshita S. Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. *Scanning*. 1994;16:305-6.
146. Tooke JE, Goh KL. Vascular function in Type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: the case for intrinsic endotheiopathy. *Diabet Med*. 1999;16:710-5.
147. Tournier JN, Hellmann AQ. Neuro-immune connections: evidence for a neuro-immunological synapse. *Trends Immunol*. 2003;24:114-5.
148. Tran CH, Routledge C, Miller J, Miller F, Hodson SA. Examination of murine tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3520-5.
149. Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*. 1959;7:230-5.
150. Veres TZ, Rochlitzer S, Shevchenko M, Fuchs B, Prenzler F, Nassenstein C, Fischer A, Welker L, Holz O, Müller M, Krug N, Braun A. Spatial interactions between dendritic cells and sensory nerves in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:553-61.
151. Vonderahe AR., Corneal and scleral anesthesia of the lower half of the eye in a case of trauma of the superior maxillary nerve. *Arch. Neurol. Psychiatr. Chicago* 20, 1928;836-837.

152. Watkins SC, Salter RD. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*. 2005;23:309-18.
153. Wen Y, Skidmore JC, Porter-Turner MM, Rea CA, Khokher MA, Singh BM. Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2002;4:305-8.
154. Whitear M., An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *J Anat*. 1960;94:387-409.
155. Winter WE., Harris N, Schatz D. (2002). Immunological Markers in the Diagnosis and Prediction of Autoimmune Type 1a Diabetes. *Clinical Diabetes* 2002;20:183-191
156. Yamagami S, Hamrah P, Miyamoto K, Miyazaki D, Dekaris I, Dawson T, Lu B, Gerard C, Dana MR. CCR5 chemokine receptor mediates recruitment of MHC class II-positive Langerhans cells in the mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1201-7.
157. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294:284-6.
158. Yan F, Cai L, Hui Y, Chen S, Meng H, Huang Z. Tolerogenic dendritic cells suppress murine corneal allograft rejection by modulating CD28/CTLA-4 expression on regulatory T cells. *Cell Biol Int*. 2014 Mar 7.
159. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928:200-11.
160. Zander E., Weddell G., Observations on the innervation of the cornea. *J Anat*. 1951; 85:68-99.
161. Zeng XX, Ng YK, Ling EA. Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci*. 2000;17:463-71.
162. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32.
163. Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff RF. In vivo confocal microscopy of the ocular surface. *Ocul Surf*. 2006;4:81-93.
164. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243:1056-61.

165. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. *Cornea*. 2007;26:47-54.
166. Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, Peschel S, Harder V, Schober HC, Kundt G, Baltrusch S, Guthoff RF, Stachs O. Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy. *PLoS One*. 2013;8:e52157.
167. Zychowska M, Rojewska E, Przewlocka B, Mika J. Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy - experimental and clinical studies. *Pharmacol Rep*. 2013;65:1601-10.

## 10 PUBLIKATIONSLISTE

**Leppin K, Behrendt AK, Reichard M, Stachs O, Guthoff RF, Baltrusch S, Eule JC, Vollmar B.** Diabetes Mellitus Leads to Accumulation of Dendritic Cells and Nerve Fiber Damage of the Subbasal Nerve Plexus in the Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Apr 29;55(6):3603-3615.

## 11 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts der Experimentellen Chirurgie Rostock, für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Corinna Eule, der Ophthalmologin der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin, für die konstruktive Betreuung und Zusammenarbeit.

Weiterhin spreche ich dem gesamten Team des Instituts der Experimentellen Chirurgie meinen Dank aus.

Aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meinen lieben Eltern bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ich diese Arbeit nie hätte erstellen können.

Meinem lieben Mann gilt ebenfalls mein aufrichtigster Dank. Er stand mir in jeder Minute zur Seite.

Meinen Großeltern möchte ich danken, dass Sie immer für mich da waren.

Meiner Schwester danke ich an dieser Stelle gleichermaßen. Mit ihr ging ich die wichtigsten Schritte meines Lebens.

## 12 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit „Diabetes mellitus führt zur Akkumulation von dendritischen Zellen und zur Zerstörung des subbasalen Nervenplexus der Cornea in der Maus“ selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer von den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet zu haben. Die benutzten Werke sowie inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, 15.08.2014

Katja Leppin