

**Einsatz der Dynamischen Lichtstreuung  
zur in-vitro-Analyse  
von Glaskörperproteinen des Schweineauges**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der  
Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**vorgelegt von**

**Tobias Reipen  
aus Düsseldorf**

**2008**

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1.Gutachter: PD Dr. rer. nat. A. R. Wegener  
2.Gutachter: Prof. Dr. med. H.J. Biersack

Tag der Mündlichen Prüfung: 24. April 2008

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Frank G. Holz

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

gewidmet meiner Familie, meiner Frau,  
und im Besonderen  
meinen verstorbenen Großeltern

Dr. med. Walter Reipen	1914 – 1994
Dr. med. Kurt Franke	1915 – 2002
Dr. med. Ida Franke	1920 – 2004



<b>1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>2 THEORETISCHER TEIL .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Glaskörper (Corpus vitreum) .....</b>	<b>11</b>
2.1.1 Anatomie und Funktion des Glaskörpers .....	11
2.1.2 Embryologie und Altersveränderungen des Glaskörpers.....	12
<b>2.2 Diabetes mellitus und dessen Augenkomplikationen .....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Diabetes mellitus - Überblick.....	16
2.2.2 Diabetische Mikroangiopathie .....	19
2.2.2.1 Pathogenese, insbes. nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen .....	19
2.2.3 Proliferative diabetische Vitreoretinopathie .....	24
2.2.3.1 Diabetische Veränderungen der Glaskörperkomponenten.....	28
<b>2.3 Interventionen an Netzhaut und Glaskörper .....</b>	<b>30</b>
<b>2.4 Vitamin C im Auge .....</b>	<b>32</b>
2.4.1 Vitamin C – Überblick.....	32
2.4.2 Konzentrationen in den verschiedenen Augenkompartmenten.....	34
2.4.3 Funktionen von Vitamin C bei Diabetes mellitus und im Auge.....	36
<b>2.5 Modell Schweineauge.....</b>	<b>38</b>
<b>2.6. Dynamische Lichtstreuung (DLS – Dynamic Light Scattering) .....</b>	<b>39</b>
2.6.1 DLS – Überblick.....	39
2.6.2 Physikalische Grundlagen .....	40
2.6.3 Messprinzip und Messapparatur .....	44
<b>3 EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Kollagenpräparation .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Probenansätze und Inkubationszeiten .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3 Messungen .....</b>	<b>50</b>

<b>4 VERSUCHSERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
4.1 Messung der Latexteilchen zur Bestimmung des Viskositätseinflusses .....	51
4.2 Ergebnistabelle .....	51
4.3 Ergebnisgrafiken.....	52
4.4 Ergebniserläuterungen.....	53
<b>5 DISKUSSION DER VERSUCHE .....</b>	<b>56</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>85</b>
<b>9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>86</b>
<b>10 ANHANG.....</b>	<b>87</b>
<b>11 DANKSAGUNG.....</b>	<b>94</b>
<b>12 LEBENSLAUF.....</b>	<b>95</b>

## 1 Einleitung und Problemstellung

Der Glaskörper (GK) des Auges stellt die größte Masse bindegeweblicher Interzellulärsubstanz unseres Körpers dar. Neben Wasser (H<sub>2</sub>O) besteht er aus einem Netz von Kollagenfibrillen und Hyaluronsäuremolekülen. Durch diese Beschaffenheit erhält der Glaskörper seine gelartige Konsistenz, mit der er das Augenninnere ausfüllt und die Netzhaut vor Stößen und plötzlichen Bewegungen schützen soll (Sachsenweger 1994).

Ablagerung von Metaboliten, Zusammensintern und Verdickung der Kollagenfasern, Bildung von wassergefüllten Lakunen, Glaskörperabhebung von der Netzhaut und eine langsame Auflösung des natürlichen Glaskörpergerüsts tragen zum normalen Alterungsprozess des Corpus vitreum (Glaskörper) bei und werden unter dem Begriff „Glaskörperdegenerationen“ zusammengefasst.

Dieser Alterungsprozess beginnt schon im Alter von 45-50 Jahren. Es lässt sich die Abnahme der gelförmigen GK-Struktur im Gegensatz zur Zunahme der flüssigen GK-Struktur nachweisen (Oksala 1978).

Beim Diabetiker finden vitreale Alterungsprozesse, wie Glaskörperverflüssigung und hintere Glaskörperabhebung, verfrüht und häufiger statt (Sebag and Balazs 1984, Foos et al 1980). Im Rahmen der nicht-enzymatischen Glykosylierung findet man Quervernetzungen des vitrealen Kollagens (Perejda and Uitto 1982), das Glaskörpergerüst schrumpft, damit fällt die GK-Struktur zusammen und es kommt zur Aggregation der Glaskörperbestandteile (Sebag 1989). Dies kann über Traktionen zu lokalisierter Stimulation der vaskulären Proliferation (Lemmen 1995) bis hin zu Traktionsablösungen der Netzhaut führen.

Diabetes mellitus gewinnt aufgrund seines zunehmend epidemieartigen Charakters grundsätzlich an volkswirtschaftlicher Bedeutung. Zum einen stellt Diabetes mellitus aufgrund seiner kardiovaskulären Risiken mit einer deutlich erhöhten Sterblichkeit eine der wesentlichen ärztlichen Herausforderungen der nächsten Jahrzehnte dar, zum anderen verursacht Diabetes mellitus aufgrund von Amputationen, Nierenversagen und Augenkomplikationen einen der größten Kostenfaktoren im Gesundheitswesen. In

Bezug auf die interdisziplinäre Versorgung von Menschen mit Diabetes mellitus ist hervorzuheben, dass das Auge nicht nur Ort einer der vaskulären Komplikationen sein kann, sondern die Gefäßsituation im gesamten Körper widerspiegelt. Die ophthalmologische Diagnostik spielt daher bei der vaskulären Klassifikation des Patienten mit Diabetes mellitus eine wichtige Rolle (Hammes 2004).

Die diabetische Retinopathie (DR) ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes und die häufigste Erblindungsursache im Erwachsenenalter bis etwa 75 Jahre (Harris 1998). In Deutschland erblinden schätzungsweise 6000-10.000 Patienten mit Diabetes mellitus jährlich (DCCT, 2000).

Obwohl die Prognose durch Lasertherapie und vitreoretinale Chirurgie wesentlich verbessert werden konnte, stellt die diabetische Retinopathie (DR) in den Industrienationen immer noch die Haupterblindungsursache im mittleren Lebensabschnitt dar.

Nichtproliferative Stadien der DR kann man zurzeit weder konservativ noch chirurgisch behandeln. Nach neuen Behandlungsverfahren, insbesondere nach pharmakologischen Möglichkeiten zur Therapie der DR wird intensiv gesucht.

Die heutige Therapie der diabetische Retinopathie beinhaltet zunächst die internistische Einstellung des Zuckers sowie die Einstellung der zusätzlichen Risikofaktoren.

Beginnt die nichtproliferative Retinopathie in eine proliferative überzugehen, sollte mit einer Lasertherapie der Netzhaut begonnen werden.

Ist es zu einer proliferativen Entwicklung gekommen, die den Glaskörper mitbetrifft oder zu einer Netzhautablösung führt, ist eine vitreoretinale Chirurgie nicht zu umgehen.

Aufgrund der auftretenden Komplikationen und der Schwierigkeiten einer Vitrektomie für den Operateur liegt es nahe, sich über alternative therapeutische Verfahren Gedanken zu machen.

Wäre es möglich die diabetischen Veränderungen des Glaskörpers zu beeinflussen, könnte man diese Operation möglicherweise um einige Zeit hinausschieben oder sogar vermeiden.

Heute versucht man experimentell durch Injektionen biochemischer Substanzen in den Glaskörperaum Veränderungen zu erreichen. Verschiedene Substanzen sind in klinischen Studien oder zum Teil bereits auf dem Markt. Teilweise werden sie zur Hilfe genommen, um den Glaskörper vor einer Vitrektomie von der Retina zu lösen.



Genauere Untersuchungen zur Beschaffenheit des GK vor, während und nach diesen Injektionen sind noch nicht verfügbar.

Diese Arbeit stellt die diabetischen Veränderungen des Glaskörpers auf molekularer Ebene am in-vitro Modell des Schweineauges dar. Gemessen werden Grössenunterschiede von lysierten Kollagenfibrillen des Schweineglaskörpers, die zuvor einem diabetischen Milieu ausgesetzt waren, mittels der Methode der Dynamischen Lichtstreuung.

Dynamische Lichtstreuung (**D**ynamic **L**ight **S**cattering – DLS) ist eine laserbasierte Methode zur Messung der Molekülgröße in viskösen, transparenten Suspensionen. Der Glaskörper im Inneren des Auges ist für diese Untersuchungsmethode gut geeignet. Die transparente Struktur, bestehend aus Kollagen, Hyaluronsäure und Wasser kann durch DLS auf ihre Beschaffenheit im Experiment und auch im Auge (in-vivo) untersucht werden (Sebag 1999). Man kann Veränderungen im Glaskörper, die z.B. durch Alterung und/oder unter krankhaften Bedingungen, wie sie z.B. durch Diabetes mellitus vorkommen, darstellen.

Erste Versuche an Rinderaugen zeigten, dass diese strukturellen, durch nicht-enzymatische Glykosylierung induzierten Kollagenveränderungen innerhalb des diabetischen Glaskörpers anhand in-vitro gemessener Proben mittels DLS nachweisbar sind. Looke konnte die Größenveränderungen anhand von Kollagenfragmenten aus Rinderglaskörper mit DLS aufzeigen (Looke 2003).

Schweineaugen, welche als organisches Substrat für diese Arbeit dienen, bilden ein anatomisch und physiologisch besseres Modell als das Rinderauge. Sie besitzen nahezu identische Grössenverhältnisse wie das menschliche Auge, der Pigmentierungsgrad ist dem des Auges des Mitteleuropäers ähnlich und die metabolische Dynamik ist vergleichbar. Auch fehlt dem Schweineauge, wie auch dem humanen Auge, das Tapetum Lucidum, eine Reflektorschicht hinter der Netzhaut. Somit kommt diese Arbeit Untersuchungen am menschlichen Auge sehr nahe.

Vorherige experimentelle Arbeiten zeigten eine Verdickung der Kollagenfragmente des Glaskörpers während der Diabeteserkrankung (Looke 2003).

Der therapeutische Ansatz dieser Arbeit zeigt eine Möglichkeit auf, den Glaskörper mittels einer möglichst schonenden Vitreolyse (Auflösung der Strukturelemente des Glaskörpers) zu beeinflussen und diese Veränderungen des Stützapparates nicht-invasiv darstellen zu können.

Aufgabe sollte es sein, eine Vitreolyse von zuvor experimentell glykosyliertem GK-Kollagen mit Vitamin C mittels der DLS Messung zu untersuchen. Das DLS-Messverfahren ist nicht-invasiv und aufgrund seiner Scan-Charakteristik ohne Belastungsrisiko für die Netzhaut des Menschen einsetzbar. Bei Evaluierung dieser Versuchsmethodik könnte man sich ein ähnliches Gerät auch integriert in eine augenärztliche Untersuchungseinrichtung vorstellen, um mit der DLS-Methode einerseits Veränderungen im Glaskörper schon frühzeitig nachzuweisen und andererseits therapeutische GK-Veränderungen analytisch zu begleiten.

## **2 Theoretischer Teil**

### **2.1 Glaskörper (Corpus vitreum)**

#### **2.1.1 Anatomie und Funktion des Glaskörpers**

Der Glaskörper (GK), der sich zwischen Linse und Retina ausbreitet, nimmt ca.  $\frac{4}{5}$  des Augenvolumens ein. Er besteht zu 99% aus Wasser, der Rest setzt sich größtenteils aus Kollagen und Hyaluronsäure zusammen. Sein spezifisches Gewicht beträgt 1,0060. Die hohe Viskosität des gelartigen, zellfreien Glaskörpers ist durch seinen hohen Gehalt an Hyaluronsäure bedingt, die von den unpigmentierten Epithelzellen der Pars plana sezerniert wird. Gefäße und Nerven kommen im gesunden Corpus vitreum nicht vor. Dadurch ist das Gewebe bradytroph und wird durch Diffusion ernährt.

Der GK hat zwei Bestandteile: eine wässrige Phase (Humor vitrei) und eine feste Phase (Residualprotein).

Dünne bindegewebige Septen führen zu einer anatomischen Unterteilung des Glaskörpers in drei Abschnitte (Eisner 1982). Der Tractus praeretinalis zieht von der Papille zum hinteren Ende der Ora serrata. Er begrenzt medial die präretinale Glaskörperzone, die der Membrana limitans interna der Retina dicht anliegt. Die Mikrofibrillen des Kortex verankern sich im ganzen Bereich der Retina, aber auch im Bereich der Pars plana des Ziliarkörpers mit der Membrana limitans interna.

Der Tractus retrolenticularis zieht von der Papille zur Seitenwand der vorderen Glaskörperbucht (Fossula lentis), in der die Linse liegt. Durch die Linse ist der Glaskörper vorn eingedellt (Fossa patellaris). Dieses bindegewebige Septum steht in Kontakt zu Zonulafasern, die von Bündeln der Haltefasern des Zonulaapparates zum Kortex des Glaskörpers abzweigen. Zwischen Tractus praeretinalis und Tractus retrolenticularis dehnt sich die Intermediärzone des Glaskörpers aus.

Die mittlere, retrolentikuläre Zone des in Schichten aufgebauten Glaskörpers wird von einem individuell unterschiedlich erhaltenen, trichterförmigen Kanal (Canalis hyaloideus, Cloquet'scher Kanal) durchzogen. Durch diesen zieht in der Embryonalzeit die Arteria hyaloidea mit ihrer Gliahülle zur Hinterfläche der Linse, wo sie die Tunica vasculosa

lentis versorgt. Diese bildet sich während der Fetalentwicklung zurück, sodass der Cloquet'sche Kanal post partum leer ist.

Für die Bildung des fibrillenreichen Kortex und der Glaskörpersepten werden Hyalozyten verantwortlich gemacht. Es handelt sich um amöboid bewegliche Zellen, die sich zwischen Membrana limitans interna und dem Cortex vitrei, vorwiegend entlang den Ästen der Arteria centralis retinae, fortbewegen. Die Herkunft der Hyalozyten ist noch unklar (Balazs et al 1980).

Die wichtigste Funktion des Glaskörpers liegt neben der Transparenz darin, die empfindliche Architektur der Netzhaut vor mechanischen Kräften zu schützen, indem diese gepuffert und auf eine größere Fläche verteilt werden (Marshall et al. 1993). So können etwa Erschütterungen des Augapfels, wie z.B. durch Augenmuskelzug bei Blickbewegungen oder Druck/Stoß von außen, durch seine besondere Struktur aufgefangen werden. Darüber hinaus übt der Glaskörper die Funktion einer Barriere zwischen vorderem und hinterem Bulbusabschnitt aus und ist am dioptrischen Apparat, dem lichtbrechenden System des Auges, beteiligt (Hollwich 1988).

### **2.1.2 Embryologie und Altersveränderungen des Glaskörpers**

Die Ausbildung des sekundären Glaskörpers, der später den größten Teil des Auges ausfüllt, ist der zweite Schritt seiner Entwicklung und ersetzt den primären Glaskörper. Der primäre Glaskörper entsteht als zellulärer Glaskörper etwa im 10mm-Stadium des Föten.

Die Entwicklung des avaskulären sekundären Glaskörpers beginnt im 13mm-Stadium des Föten. Die Entwicklung des primären Glaskörpers ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen, sie schreitet noch bis zum 40mm-Stadium des Föten (9.Woche) fort.

Die Produktion von Kollagen stellt die Entstehung des sekundären Glaskörpers dar. Die Verbindung zwischen primärem und sekundärem Glaskörper bildet die spätere Begrenzung des Cloquet'schen Kanals, der auch bei ausgewachsenen Augen nachweisbar sein kann. Der Cloquet'sche Kanal vermag zelluläre Elemente fortzuleiten, z.B. Entzündungszellen bei Entzündungen des vorderen Augenabschnitts zum hinteren

Augenpol (Hypothese zur Entstehung eines Irvine-Gass-Syndroms) oder Retinoblastomzellen von der Retina in Richtung der vorderen Augenabschnitte (Hypothese des Pseudohypopyon in der Vorderkammer beim Retinoblastom). Auch Botenstoffe z.B. Prostaglandine oder Wachstumsfaktoren können durch ihn von Pol zu Pol wandern. Ab dem 40mm-Stadium beginnt der primäre Glaskörper sich in Phasen zurückzubilden.

In der fetalen und embryonalen Entwicklung des Glaskörpers wird außer Typ II Kollagen auch Typ I Kollagen produziert (Falbe-Hansen et al 1969). Die Produktion des Glaskörperkollagens soll jedoch im humanen Auge zum Zeitpunkt der Geburt abgeschlossen sein, dieses folgert Balazs aus der Tatsache, dass nach einer Vitrektomie kein Kollagen mehr produziert wird (Freeman et al 1968).

Hyaluronsäure wird als weiterer wesentlicher Bestandteil des Glaskörpers präpartal erst zu einem relativ späten Zeitpunkt synthetisiert (Freeman et al 1968; Jongebloed and Worst 1987). Zuerst wird die Hyaluronsäure von der Neuroretina produziert, später hauptsächlich von den Hyalozyten.

Die Altersveränderungen des Glaskörpers lassen sich laut Sebag einteilen und anhand weniger Oberbegriffe definieren (Sebag, 1989).

Erstens spricht man von Veränderungen der Rheologie, den Fließeigenschaften der Glaskörperflüssigkeit. Das Corpus vitreum besteht aus einer Gel- und einer Flüssigkeits-Phase. Versuche aus der Arbeit von Sebag zeigen, dass sich das Verhältnis der Gel-Phase zum Ende des Lebens verringert und in ein Überwiegen der flüssigen Bestandteile übergeht (Sebag 1989). Bei einem Alter von über 80 Jahren liegt mehr als die Hälfte des Glaskörpers in flüssiger Form vor, wie in Abbildung 1 dargestellt (Balazs et al, 1978). Dieser Prozess beginnt im Zentrum des Corpus vitreum, was klinisch und post mortem gezeigt werden konnte. Man geht davon aus, dass die Hyaluronsäure-Kollagen-Interaktion eine entscheidende Rolle in diesem Verflüssigungsprozess spielt. Eine enzymatische Zerstörung in-vivo ist unwahrscheinlich, aber eventuell könnte der Abbau der Vernetzung der Fibrillen, also der Crosslinks, eine Verflüssigung bewirken.

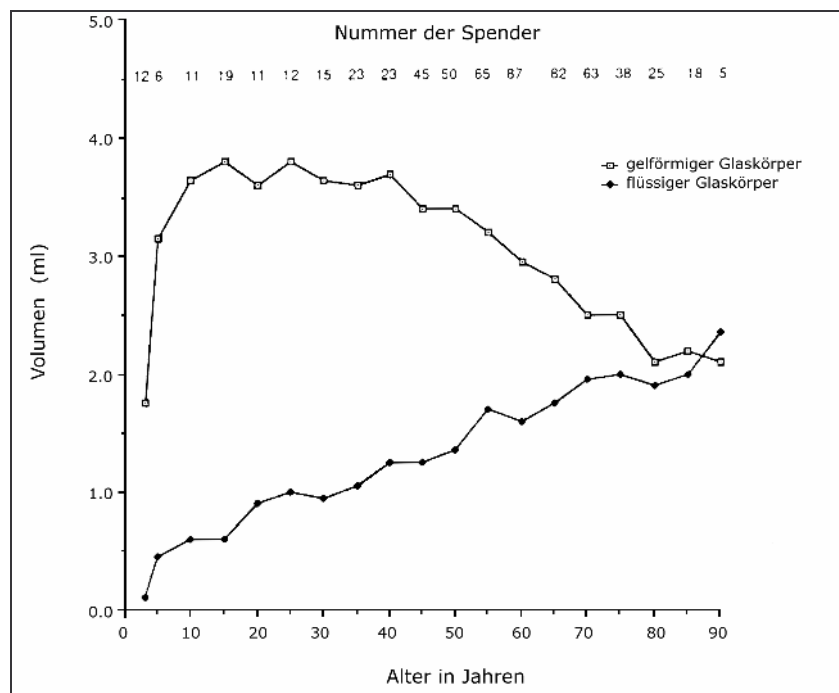


Abb.1 Verflüssigung des Glaskörpers (nach Balazs et al, 1989)

In Bezug auf die biochemischen Verhältnisse im GK während des Alterungsprozesses fand man heraus, dass die Kollagen-Konzentration bei 70-90 Jährigen größer ist als bei den wesentlich jüngeren Patienten zwischen 15 und 20 Jahren. Allerdings führt man dies darauf zurück, dass die Gel-Phase des Glaskörpers abnimmt und daher eine größere Menge vernetzten Kollagens im Gelkompartiment messbar wird. Die Kollagenfibrillen sind zu Bündeln gepackt und wahrscheinlich durch Crosslinks verbunden. Die Alterung von Kollagen ist assoziiert mit einer Erhöhung der Crosslinks und damit mit einer Abnahme der Löslichkeit, erhöhter Steifigkeit und erhöhter Resistenz gegen enzymatischen Abbau (Sebag 1989).

Altersveränderungen des Glaskörpers sind zum einen die Veränderungen der Basalmembran. Sie verdickt im Laufe der Zeit, so wie alle Basalmembranen des Körpers. Im Auge ist besonders die innere Grenzmembran betroffen. Der Alterungsprozess führt zu einer Verdickung, bei der die Müller'schen Zellen für die Zellproliferation sorgen. Insbesondere Glaskörpertraktionen der Netzhaut können dieses Phänomen verstärken, da sie durch Zug den Anreiz zur Zellproliferation erhöhen. Zum anderen verändert sich die Verbindung zwischen Glaskörper und Netzhaut innerhalb des Alterungsprozesses. Der Ansatz hinter der Ora serrata wird wesentlich

breiter, so dass sich die Problematik von Adhäsionskräften potenziert und es schneller zu größeren Komplikationen, wie traktiven Netzhautforamen, kommen kann. Die bekannteste Veränderung des Glaskörperansatzes an der Netzhaut ist die altersbedingte hintere Glaskörperabhebung. Verantwortlich für die Anheftung zwischen Glaskörper und Netzhaut sind die Müllerzellen (Kloti 1967), durch ihr Absterben kommt es zur vollständigen oder teilweisen hinteren Glaskörperabhebung. Im Alter über 65 Jahren findet man über 65% hintere Glaskörperabhebungen, bei Myopen (Kurzsichtigen) kommt die Abhebung ungefähr 10 Jahre früher (Pischel 1952, Lindner 1966). Da eine vollständige hintere Glaskörperabhebung bei einer ggf. anstehenden Vitrektomie eine deutliche Reduzierung des Operationsrisikos (intraoperative Netzhautlöcher/-ablösung) bedeutet, ist die pharmakologische Induzierung einer vollständigen hinteren Glaskörperabhebung Bestandteil heutiger Forschungsstudien (Gandorfer A, Kampik A 2000).

Die Grundstruktur des Glaskörpers verändert sich ebenfalls. Am Anfang des Wachstums sind die Kollagenketten und die Hyaluronsäure zu Bündeln geschnürt und so kommt es zu parallel liegenden Fibrillen, auch Fasern genannt. Im Alter werden diese feinen Faserbündel dick und unregelmäßig gewunden, so dass die homogene Struktur verloren geht. In mitten dieses Körpers bilden sich Lakunen, in denen die Verflüssigung des Glaskörpers beginnt. Es bilden sich verdickte, unregelmäßige Kollagenfasern, die so zu unregelmäßigen Strahlengängen des Lichtes innerhalb des Glaskörpers führen. Bei einer hinteren Glaskörperabhebung kann es zum Kollabieren des gesamten Corpus vitreum kommen (Sebag 1989).

## 2.2 Diabetes mellitus und dessen Augenkomplikationen

### 2.2.1 Diabetes mellitus - Überblick

Diabetes mellitus ist eine erbliche und chronische Stoffwechselerkrankung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht, und in deren Folge zumeist erst nach längerer Krankheitsdauer Schäden an Blutgefäßen und Nervensystem auftreten können.

1997 hat die WHO (World Health Organisation) und die ADA (American Diabetes Association) eine Klassifikation eingeführt, wonach man einteilt in:

- Typ1 – Diabetes (insulinabhängig):  
β-Zelldestruktion, die zum absoluten Insulinmangel führt
  - Immunologisch bedingt
  - Idiopathisch (in Europa selten)
  
- Typ2 – Diabetes (insulinunabhängig):  
Dieser kann sich erstrecken von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz
  
- Gestationsdiabetes
  
- spezifische Typen:
  - Genetische Defekte in der β-Zellfunktion
  - Seltene genetische Defekte der Insulinwirkung
  - Chronische Pankreatitis
  - Endokrinopathien
  - Medikamentös induzierter Diabetes (z.B. durch Kortison)
  - Infektionen als Auslöser
  - Seltene immunologisch bedingte Formen
  - Genetische Syndrome, die gelegentlich mit Diabetes vergesellschaftet sind



Die Mehrzahl der Diabetes Erkrankungen entwickelt sich auf dem Boden eines metabolischen Syndroms (Wohlstands syndrom). Dies zeichnet sich durch gehäuftes Zusammentreffen von Stammfettsucht, Dyslipoproteinämie (Triglyceride ↑, HDL-Cholesterin ↓), Hyperurikämie, essentieller Hypertonie und Glukosetoleranzstörungen bzw. Typ 2-Diabetes mellitus aus. Am Anfang des metabolischen Syndroms besteht eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe (z.B. Skelettmuskelgewebe), so dass erhöhte Insulinspiegel erforderlich werden. Die Hyperinsulinämie erhöht das Hungergefühl, führt zu Adipositas und begünstigt die Entwicklung einer Arteriosklerose (Herold, 2001). Dies erfordert eine weitere Steigerung der Insulinspiegel.

Therapeutisches Prinzip ist damit die Beseitigung von Hyperalimentation und Fettsucht, denn durch absinkende Insulinspiegel erhöht sich wieder die Sensibilität und Dichte der Rezeptoren.

Andere Manifestationsfaktoren für den Typ 2-Diabetes sind Stressfaktoren (Infektionen, Traumen, Herzinfarkt, u.a.).

Der Typ 1-Diabetes basiert auf einer Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln durch Autoimmuninsulinitis mit dadurch resultierendem absoluten Insulinmangel, wobei genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle spielen. Das vorwiegende Manifestationsalter liegt zwischen dem 15.-24. Lebensjahr. 20% der Typ 1-Diabetiker haben eine positive Familienanamnese (mit Typ 1-Diabetes) und über 90% der Patienten haben die genetischen HLA-Merkmale DR3 und/oder DR4.

Für eine Autoimmuninsulinitis beim frisch manifestierten Typ 1-Diabetes sind Infiltration der Langerhans'schen Inseln mit autoreaktiven T-Lymphozyten, sowie der Nachweis von Autoantikörpern in 70-90% der Fälle, sowie die Remission unter immunsuppressiver Behandlung charakteristisch.

In 70-90% der Fälle lassen sich Inselzellantikörper (ICA), Insulinautoantikörper (IA), Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der  $\beta$ -Zelle (GADA) und/oder Antikörper gegen Tyrosinphosphatase (IA-2A) nachweisen, ICA und IA sogar schon vor Manifestation der Krankheit (Herold 2001).

	<b>Typ 1 insulinabhängig</b>	<b>Typ 2 insulinunabhängig</b>
<u>Pathogenese</u>	Insulinmangel	Insulinresistenz
<u>Körperbau</u>	asthenisch	meist pyknisch/adipös
<u>Beginn</u>	oft rasch	langsam
<u>Vorw. Manifestation</u>	15.-24. LJ	>40. LJ
<u>B-Zellen</u>	auf <10% vermindert	nur mäßig vermindert
<u>Plasmainsulin/C-Peptid</u>	niedrig bis fehlend	anfangs erhöht
<u>Autoantikörper</u>	+	-
<u>Stoffwechsellage</u>	labil	stabil
<u>Ketoseneigung</u>	stark	gering
<u>Insulintherapie</u>	erforderlich	nur bei Erschöpfung der Insulinreserven

Abb. 2: Diabetes mellitus (Herold 2001)

Der Diabetes mellitus zieht nach einer gewissen Krankheitsdauer fast grundsätzlich Folgeerscheinungen mit sich. Diese Komplikationen lassen sich einteilen in:

- Makro- und Mikroangiopathie
- Resistenzminderung mit Neigung zu bakteriellen Haut- und Harnwegsinfektionen
- Hypertriglyceridämie und Fettleber
- Hyporeninämischer Hypoaldosteronismus mit Hyperkaliämie, Hyponatriämie, metabolischer Acidose und evtl. Hypotonie

Die Hauptkomplikationen werden durch die Gefäßschäden verursacht. Man unterteilt die diabetischen Angiopathien in eine unspezifische Makroangiopathie und die diabetesspezifische Mikroangiopathie mit Verdickung der kapillären Basalmembranen. Die Dicke der Basalmembran korreliert zur Dauer des Diabetes (Starke 1995).

Die diabetische Retinopathie (DR) ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes und die häufigste Erblindungsursache im Erwachsenenalter bis etwa 75 Jahre (Harris 1998). Während man früher vom diabetischen Spätsyndrom sprach, zeigen Daten des „Diabetes Control und Complication Trial“ (DCCT), dass vor Ablauf von 5 Jahren Diabetesdauer insgesamt 67% der Patienten mit Typ 1 Diabetes mindestens eine milde, nichtproliferative diabetische Retinopathie entwickelt haben (Malone et al 2001). Daher muss man davon ausgehen, dass die chronische Hyperglykämie die

Gefäße deutlich aggressiver schädigt als bisher angenommen (Hammes 2004). Der Krankheitsbeginn bei Typ 1 Diabetes wird klinisch nur selten übersehen.

Unauffälliger ist der Beginn bei Typ 2 Diabetes. Nach den Erhebungen der UKPDS (UK Prospective Diabetes Study Group) haben bereits 36% aller Patienten mit neu entdecktem DM Typ II retinale Veränderungen im Sinne einer zumindest milden, nicht-proliferativen Retinopathie (UKPDS 1998). Durch lineare Extrapolierung der Verlaufsdaten der UKPDS kann man schätzen, dass eine Retinopathie bereits mit 14 Jahren (95% Konfidenzintervall 9-23 Jahre) bestanden haben kann. Da diese Patienten nicht nur ein höheres Risiko auf Progression haben, sondern auch ein höheres Risiko zur Progression fortgeschrittener Retinopathiestadien, und diese Stadien mit einer erheblich erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert sind, kommt der frühzeitigen Identifikation von Mikroaneurysmen (MA) eine erhebliche Rolle zu. Wie die Mikroalbuminurie im Labor stellen also Mikroaneurysmen als ophthalmologische Diagnose aus diabetologischer Sicht einen sensitiven Frühindikator erhöhter kardiovaskulärer Mortalität dar.

## **2.2.2 Diabetische Mikroangiopathie**

### **2.2.2.1 Pathogenese, insbes. nicht-enzymatische Glykosylierung von Proteinen**

Unter diabetischer Mikroangiopathie versteht man das Auftreten von charakteristischen, histomorphologischen Gefäßveränderungen in drei recht unterschiedlichen Gewebestrukturen im Sinne einer Triopathie: in der Retina, den Nierenglomerula und dem Nervengewebe.

Die Ursachen für diese Veränderungen sind biochemisch-metabolisch verursachte Endothelläsionen mit einer sekundären Permeabilitätserhöhung und Verdickung der Basalmembranen.

In den Gefäßsystemen führt der Untergang von Perizyten zu Exsudation und Aussackung von Gefäßen (Mikroaneurysmen).

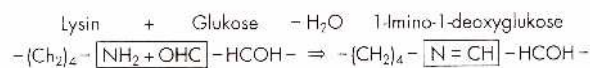
Biochemisch gesehen ist die Permeabilitätserhöhung durch die glukose-toxische Hyperglykämiewirkung mit Bildung von „Advanced Glycation Endproducts“ (AGE) und

Quervernetzungen (Crosslinks) innerhalb der Matrixstrukturen eine Reaktion, die grundsätzlich in allen kleineren Gefäßen des diabetisch veränderten Organismus vorkommen kann. Unter den verschiedenen pathogenetischen Faktoren, die zur diabetischen Retinopathie führen, ist die Formierung und Akkumulation von AGE's entscheidend. Die verschiedensten Reaktionsbeteiligungen der AGE's verändern nicht nur Struktur und Funktion anderer Proteine, sondern führen auch zu der oben erwähnten intra- und intermolekularen Quervernetzung. Die Initialisierung aber auch die Progression der diabetischen Retinopathie wird heute der Bildung der AGE's zugeschrieben (Stitt 2003).

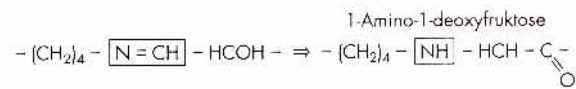
Bei der Neuropathie sind es nicht nur die Schäden der kleinsten Gefäße, der Vasa nervorum, die zu Störungen der Mikrozirkulation der Nerven führen, sondern auch direkte Schäden am Nervengewebe bzw. der Nervenscheide (Axonopathie), die die Pathogenese der Neuropathie beeinflussen.

#### Biochemische Konzepte der Mikroangiopathogenese

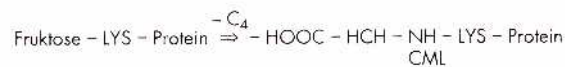
Die Genese der Mikroangiopathie beginnt mit der Maillard-Reaktion und Glykoxidation, deren Produkte als AGE (Advanced Glycation Endproducts) bezeichnet werden. Bei der klassischen Glykosylierungsreaktion bildet die Aminogruppe einer Peptidketten-Aminosäure, vorzugsweise die freie Aminogruppe von Lysin (LYS) bzw. die Diaminogruppe der Guanidyl-Seitenkette von Arginin (ARG), unter Entstehung von Wasser mit der Aldehydgruppe von Glukose eine labile Aldiminverbindung (Brownlee et al 1988, Monnier et al 1992).



Bei Körpertemperatur läuft diese Reaktion langsam und vor allem nicht-enzymatisch ab. Durch die Verschiebung von drei H-Atomen innerhalb dieser Verbindung entsteht eine stabile Ketoamin-Verbindung, ein Fructose-Lysin-Addukt. Diese H-Atom Verschiebung nennt sich Amadori-Umlagerung.



Die Amadori-Umlagerung ist die typische Sekundärreaktion für die diabetische Hyperglykämie und anhand von zahlreichen Proteinen nachweisbar. Gezeigt wird dies vor allem anhand von Hämoglobin, Albuminen, Membranproteinen, Linsenproteinen, Rezeptorproteinen und Lipoproteinen.



In einigen Geweben entsteht nach oxidativer Abspaltung von 4 C-Atomen aus Fructose-Lysin in einer Carboxyalkylierungsreaktion Carboxymethyl-Lysin (CML), dessen allmähliche Akkumulation ein altersabhängiger Prozess mit erhöhtem Nachweis in der Haut und der Dura mater ist.

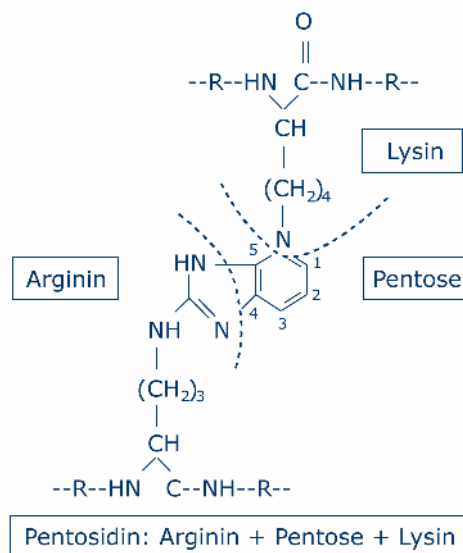
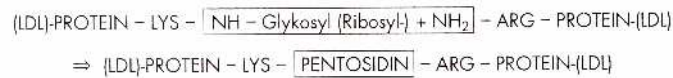
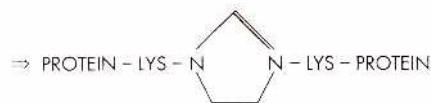
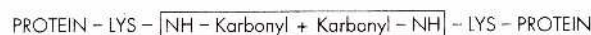
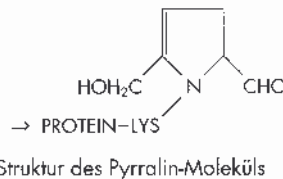


Abb. 3: Pentosidinmolekül (nach Berger)

Die Synthese von Pentosidin über Kohlenstoffabspaltung durch Glukose und Fruktose aus verschiedenen Proteinen hat pathophysiologische Bedeutung.



Mit Pentosen (Ribosyl-Bausteinen) als Substrat entsteht Pentosidin, wenn das oxidierte C<sub>5</sub>-Gerüst des Monosaccharids zwischen Lysin- und Arginin-Bausteinen von zwei Peptidketten eine stabile Querverbindung bildet. Dabei formiert sich eine kombinierte Imidazol/Pyrimidin-Ringstruktur. Protein-Pentosidin aus der irreversiblen Maillard-Reaktion einer Glykoxidation, der Kombination von Glykosylierung und Oxidation, ist der Prototyp der AGE-Produktbildung.



Beim AGE handelt es sich um eine stabile chemische Verbindung zwischen freien Aminogruppen von Proteinen und Monosacchariden (Pentosen). Pentosidin-AGE-Produkte werden von Makrophagen und Monozyten erkannt und gebunden, wenn sie in Bindegewebematrix bzw. Kollagen eingebaut sind (Brownlee 1988, Monnier 1992, Vlassara et al 1988).

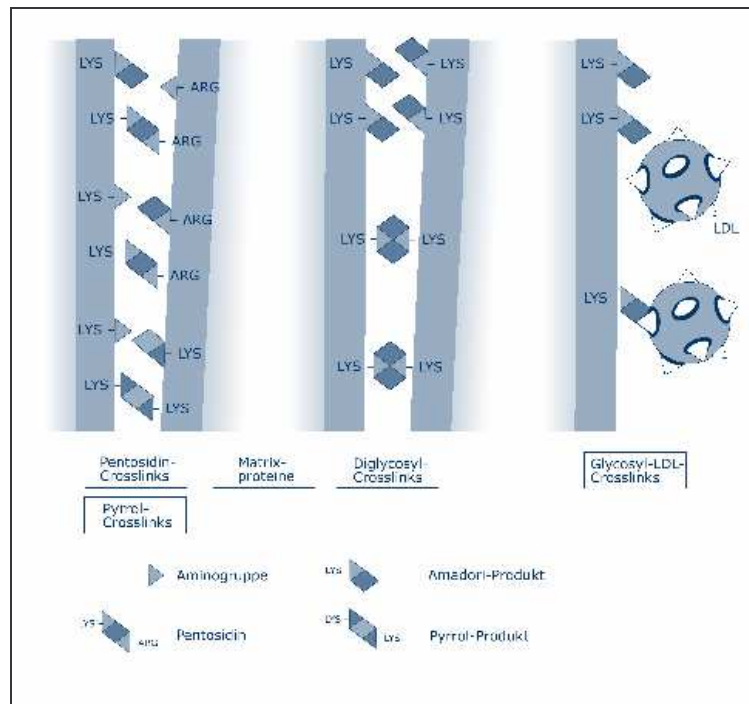


Abb. 4 Ausbildung von AGE-Crosslinks (nach Berger)

### Pathophysiologie der AGE-Formierung

Die diabetische Angiopathie ist gekennzeichnet durch die hyperglykämische Bildung von AGE an den Gefäßbasalmembranen. Kovalente Bindung von AGE an vaskuläre Bindegewebematrix führt zur Monozyten-Reaktion, die Makrophagen aktiviert, die durch spezifische Rezeptoren auf AGE-Produkte und nicht auf die frühen Glykosylierungsformen (Amadori-Verbindungen) fixiert sind.

Auch endotheliale Zellen exprimieren AGE-Rezeptoren, bei deren Interaktion mit den AGE-Liganden koagulatorische und vasokonstriktorisch wirkende Substanzen aktiviert werden. Die Reduktion von Thrombomodulin hemmt die antikoagulatorische Wirkung von Protein C, während Endothelin-1-Sekretion vasokonstriktorisch wirksam wird. So ist es also möglich, dass die durch AGE's ausgelösten Reaktionen zur Entwicklung von Ischämien und/oder fokalen Thrombosen führen.

Zur Okklusion der Mikrogefäße führt nicht nur die AGE-Akkumulation sondern auch eine in diesem Zusammenhang gefundene Senkung des lokalen Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO, EDRF) (Kohner et al 1995).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Hyperglykämie über Proteinglykierung, AGE-Formierung, Makrophagenaktivierung mit Stimulation von Proliferationsfaktoren und gefäßaktiven Faktoren zu einem komplexen Netz von Läsionen an Gefäßendothel und subendothelialer Gefäßwand führt, aber am Beginn immer die Hyperglykämie steht.

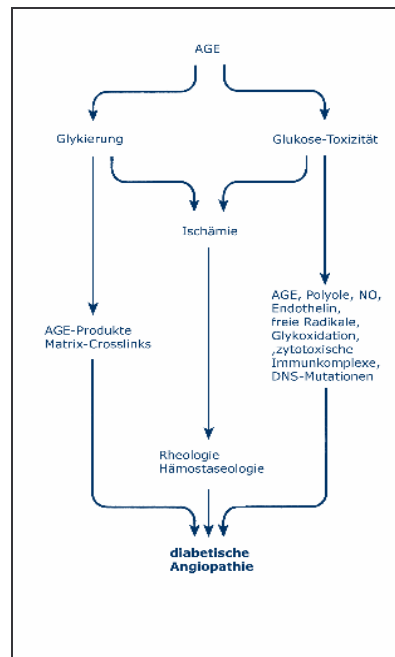


Abb. 5 Pathogenese der diabetischen Angiopathie (nach Berger)

### 2.2.3 Proliferative diabetische Vitreoretinopathie

Die proliferative diabetische Vitreoretinopathie (PDVR) ist durch schlingenartige Gefäßneubildungen aus existierenden Gefäßen, die meist zuerst an der Papille auftreten, eindeutig von der nicht-proliferativen diabetischen Retinopathie abzugrenzen. Die PDVR lässt sich in 3 klinische Stadien einteilen, anhand derer auch die spätere Therapie festgelegt wird.

Stadium A: Proliferationen entlang der hinteren Glaskörpergrenzschicht mit/ohne Glaskörperblutungen.



Stadium B: Umschriebene traktive Netzhautablösungen nasal (Bn) bzw. temporal (Bt) im Bereich der großen Gefäßbögen.

Stadium C: Traktive Abhebung der Netzhaut, bei der die Makula mit einbezogen ist. Je nach Anzahl der beteiligten Quadranten mit Netzhautabhebung werden diese Stadien als C1 bis C4 bezeichnet.

Neugebildete Gefäße, auch fibröse Membranen alleine, verursachen nahe der Glaskörpergrenzmembran noch keine Netzhautablösungen. Entscheidend für die Ablatio retinae ist die Schrumpfung der Glaskörpergrenzschicht bzw. Zug an dieser durch Veränderungen im Glaskörper selbst. Bei den diabetischen Stoffwechseleränderungen kommt es wie bei der Basalmembran der Netzhautkapillaren auch bei der hinteren Glaskörpergrenzschicht zu einer Verdickung durch Akkumulationen des Fibronektins von ca. 3000 nm auf diabetisch veränderte 30000 nm (Ferris 1996).

Diese Größenzunahme lässt folgende Wirkungen vermuten:

- Leitstruktur für proliferierende Zellen,
- AGE-Bindungen oder Wachstumsfaktorbindungen fördern erneut Gefäßproliferationen,
- der Abtransport metabolischer Endprodukte wird erschwert,
- die Diffusionskapazität zwischen Glaskörper und Netzhaut nimmt ab.

Der Einstrom von Serumproteinen in den Glaskörper durch eine langjährige Störung der Blut-Retina-Schranke, sowie rezidivierende Glaskörperblutungen führen zu einer frühzeitigen Verflüssigung des Glaskörpers und induzieren damit dessen Zusammenfall. Der entscheidende Faktor für das Schrumpfen des Glaskörpers ist Crosslinking.

Auslöser dafür ist wahrscheinlich Faktor 13 (Transglutaminase) des Blutgerinnungssystems. Diese Schrumpfungen, verbunden mit Traktionen des Corpus, verursachen unterschiedliche klinische Bilder.

Sie können zur hinteren Glaskörperabhebung führen, die bei der proliferativen diabetischen Retinopathie zwei Besonderheiten aufweist.

Häufig handelt es sich nur um die partielle Abhebung, es kann aber auch zu einer kompletten Aufspaltung (Vitreoschisis) kommen, bei der der Glaskörperkortex zerreißt, in sich zusammenfällt und nur noch einige Reste an der Netzhaut haften bleiben. Des Weiteren können Zugkräfte des Corpus vitreum dort, wo neu gebildete Gefäße eine feste, aber pathologische Brücke zwischen Glaskörper und Netzhaut aufgebaut haben, diese zum Einreißen bringen. Das führt entweder zu massiven Glaskörperblutungen oder durch Zugkräfte zur Ablösung oder zu Rissen der Netzhaut. Die hierdurch verursachten Blutungen sowie Traktionsstellen begünstigen die Entstehung von proliferativem Gefäßwachstum. Die Glaskörperadhärenzen bestimmen die unterschiedlichsten Konfigurationen der traktiven Netzhautablösung.

Zellbiologisch hat man die Pathogenese der proliferativen Vitreoretinopathie untersucht. Nach vollständiger Vaskularisation der Netzhaut, die um den Geburtstermin abgeschlossen sein sollte, findet keine Gefäßneubildung mehr statt. Erst durch pathologische Veränderungen in der Netzhaut können Gefäßproliferationen angeregt werden.

Wiedemann teilte die diabet. Vitreoretinopathie pathophysiologisch in drei verschiedene Phasen (Wiedemann und Weller 1988).

Phase 1: Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, Einstrom von Serumkomponenten

Phase 2: Migration, Adhäsion und Proliferation von Zellen in den vitreoretinalen Spalt

Phase 3: Produktion extrazellulärer Matrix, prae/epiretinale Membranen und Zugkräfte

Der entscheidende Ausgangspunkt für die Entwicklung der proliferativen diabetischen Vitreoretinopathie ist der Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke. Ihre Pars interna wird von dem retinalen Gefäßendothel mit seinen Tight junctions, die als interzelluläre Verbindungen nur für Wasser und niedermolekulare Stoffe durchlässig sind, gebildet. Die Zonulae occludentes der retinalen Pigmentepithelzellen stellen die Pars externa dar (Cuhna-Vaz 1979). Die Aufhebung dieser wichtigen Barriere zieht den Einstrom von Serumkomponenten nach sich, die eine chemotaktische und proliferationsfördernde Wirkung entfalten können (Limb et al. 1991, Cotlier und Weinreb 1992). Dazu gehören

vor allem Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Gaudric et al. 1989, Pena et al. 1994), PDGF (Robbins 1994), EGF oder FGF (Fredj-Reygrobellet 1991), sowie Bestandteile des Komplementsystems – C3, C4, C3d u.a. (Grisanti et al. 1991). Auch eingewanderte Zellen, darunter Leukozyten, können lokal Zytokine wie IL-1 oder TGF synthetisieren und damit dieses initial inflammatorische Bild der proliferativen Vitreoretinopathie prägen (Toti et al. 1994, Choudhury et al. 1997).

Die zweite Phase wird eingeleitet durch Migration, Adhäsion und Proliferation von Zellen im vitreoretinalen Raum und durch die Kontraktion der sich konfigurierenden periretinalen Membranen. Die folgenden beteiligten Zelltypen lassen sich identifizieren:

- RPE-Zellen (retinale Pigmentepithelzellen) (Machmer und Laqua 1975, Hiscott et al. 1984a)
- Fibroblasten (Newsome et al. 1981)
- Gliazellen (Laqua und Machmer 1975, Van Horn et al. 1977)
- Makrophagen (Esser et al. 1993)
- T-Lymphozyten (Charteris et al. 1992) und
- Myofibroblasten – ein mesenchymaler Zelltyp mit Merkmalen der Fibroblasten und der glatten Muskelzellen – (Walshe et al. 1992)

Die dritte Phase beginnt mit der Stabilisierung des abgelaufenen Pathomechanismus, welche durch die Produktion extrazellulärer Matrix eintritt. Die Matrix besteht aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und diversen Kollagenarten. Der Proteoglykananteil der periretinalen Membranen wird von Heparan-, Dermatan-, Chondroitinsulfaten gebildet (Jerdan et al. 1989). Die Glykoproteine bestehen zumeist aus Fibronectin und Laminin (Scheiffarth et al. 1988). Das Fibronectin spielt hier die entscheidende Rolle für die Anhaftung von Zellen bei der Bildung epiretinaler Membranen (Wagner et al. 1995). Innerhalb der Kollagene zeigen sich besonders die Typen I, III, IV, V und weniger Typ II, welcher Hauptbestandteil des Glaskörperkollagens ist (Wiedemann et al. 1990). Die RPE-Zellen sind die bedeutendste zytologische Komponente in der periretinalen Membran. Sie haben die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine zu synthetisieren und zu sezernieren. Im Verlaufe der Veränderungen ist

die Differenzierung zu sogenannten Myofibroblasten von größter Bedeutung, denn diese haben die Eigenschaften der Fibroblasten und der glatten Muskelzellen, welche zu Kontraktionskräften im epiretinalen Raum führen können (Grisanti und Guidry 1995).

### **2.2.3.1 Diabetische Veränderungen der Glaskörperkomponenten**

Lundquist hat 1994 nachgewiesen, dass bei an Diabetes erkrankten Menschen die intravitreale Glukosekonzentration ansteigt (Lundquist, 1994).

Durch den hohen Anteil an  $\epsilon$ -Aminogruppen (z.B. Lysin und Hydroxylysin) im Kollagen, dem Hauptbestandteil des Glaskörpers neben Wasser, ist dieses besonders anfällig für diabetische Veränderungen. Hyperglykämie verursacht exzessive Glukosebindungen an diesen Gruppen. Durch die AGE Bildung kommt es über Verknüpfung der einzelnen Kollagenfibrillen zur Bündelung (Brownlee 1989).

Wegen der langen biologischen Halbwertszeit von Kollagen führen diese Einflüsse zu chronischen Veränderungen im Zielorgan. Somit können Basalmembranverdickungen in den Glomeruli der Nieren, den Lungenalveolen, der Haut, im Knorpel der Gelenke und in den Basalmembranen der Gefäße im gesamten Organismus gefunden werden (Rosenbloom 1981). In der Haut wird ein zweiter diabetesbedingter Mechanismus abnormaler Kollagenverbindung beschrieben, der durch das Lysyl-Oxidase System verursacht wird (Brownlee 1989). Es findet sich eine positive Korrelation zwischen den Hautveränderungen und dem Schweregrad der Retinopathie bei Diabetespatienten (Buckingham 1990). Weiterhin findet sich eine gleichartige Korrelation zwischen dem Schweregrad der Einschränkung der Gelenkbeweglichkeit und dem Schweregrad der Retinopathie (Monnier 1986). Der Gelenkknorpel und der Glaskörper sind beide hauptsächlich aus Kollagen Typ II aufgebaut, somit lassen sich viele Erkenntnisse übertragen.

Veränderungen des Milieus, welches die Hyaluronsäure umgibt, können durch Extension oder Kontraktion des Hyaluronsäure(HA)-Moleküls in mechanische Energie umgewandelt werden. Daraus ergeben sich eine Schwellung und Schrumpfung des Glaskörpers. Dies kann unter bestimmten pathologischen Umständen, z.B. bei diabetischer Stoffwechsellage, wichtig sein. Schon die Untersuchungen von

Christiansson (Christiansson 1958) zeigen, dass alloxaninduzierter Diabetes zu einem Anstieg der Glukosaminkonzentration, zu einer Viskositätserhöhung und zu einer Abnahme des Glaskörpervolumens im Kaninchenauge führt. Spätere Untersuchungen weisen einen Anstieg der Osmolarität im diabetischen Glaskörper nach (Xiong 1979). Diese erhöhten Zuckerwerte im Glaskörper werden von Sebag bestätigt und durch die Zunahme der nicht-enzymatischen Glykosylierungsprodukte und einer enzymvermittelten Dihydroxylysinonorleucin(DHLNL)-Querverbindung in Zusammenhang gebracht (Sebag et al 1992). Diese Glykosylierungsprodukte werden durch die Raman-Spektroskopie charakterisiert und verifiziert (Sebag et al 1994). Schwankungen des systemischen Stoffwechsels und daraus folgende Schwankungen der Osmolarität und des Hydrierungsgrades des Glaskörpers können so zu einer periodischen Schwellung und Kontraktion des gesamten Glaskörpers führen.

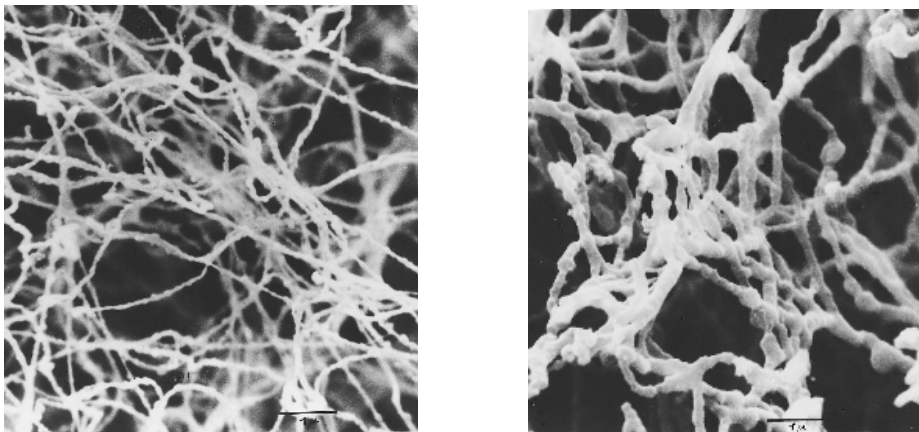


Abb. 6 Glaskörperkollagen beim gesunden Menschen (links) / beim Diabetiker (rechts)  
(elektronenmikroskopische Aufnahmen von Glaskörperkollagen  
überlassen von Dr. S. Dunker Troisdorf/Sieglar)

## 2.3 Interventionen an Netzhaut und Glaskörper

Eine medikamentöse Behandlung der diabetischen Retinopathie gibt es gegenwärtig nicht. Durch eine frühzeitige und langfristig optimale Blutzuckereinstellung, gemessen am HbA1c, können schwere Verläufe verhindert werden. Ebenso wichtig ist es, einen bestehenden Hypertonus zu regulieren.

### Laserkoagulation

Die Laserkoagulation ist heutzutage die Behandlungsmethode der Wahl, wenn eine schwere nicht-proliferative diabetische Retinopathie oder eine im Stadium A befindliche PDVR vorliegt. Das Ausmaß der koagulierten Fläche wird vom Ausgangsbefund und den nachfolgenden Kontrollen bestimmt. Durchschnittlich werden bei einer panretinalen Koagulation ca. 1000 Herde in zwei bis drei Sitzungen appliziert. Sie ist die am meisten durchgeführte Therapie bei Diabetikern. In Bezug auf den Glaskörper hat man herausgefunden, dass dieser gezielt gesetzte Entzündungsreiz bei der panretinalen Laserkoagulationstherapie an der Grenze zwischen Netzhaut und Glaskörper zu einer frühzeitigen iatrogenen Trennung dieser beiden Schichten führt. Dies hat einen positiven Effekt auf das Fortschreiten der diabetischen Vitreoretinopathie sowie auch im Falle einer anstehenden Vitrektomie, denn evtl. behindernde Traktionen des Glaskörpers werden vorzeitig gelöst (Sebag 1990).

### Vitrektomie

Die Vitrektomie ist definiert als die operative Entfernung des erkrankten Glaskörpers mit anschließendem Ersatz durch Ringerlösung, Öl, Gas oder einem anderen Substitutionsmittel als Tamponade. Dieser glaskörperchirurgische Eingriff wird bei schweren entzündlichen Veränderungen, Glaskörpereinblutungen ohne Resorptionstendenz, bei vitreoretinalen Proliferationen sowie schweren Netzhautablösungen erwogen.

Bei Einblutungen in den Glaskörper ohne Netzhautablösung lässt sich ein Abwarten bis zu einem halben Jahr vertreten. Da die Vitrektomie eine komplizierte Operation mit einem entsprechend großen Risiko darstellt (Katarakt, Sekundärglaukom, Ablatio retinae, Blutung), muss die Indikation zur Vitrektomie abgewogen werden.

## 2.4 Vitamin C im Auge

### 2.4.1 Vitamin C – Überblick

Ein gebräuchliches Synonym für Ascorbinsäure ist Vitamin C. Der Name leitet sich von den antiskorbutischen und sauren Eigenschaften der Verbindung ab. Vitamin C ist das stärkste wasserlösliche Antioxidans. Es ist wirksam gegen praktisch alle Arten von freien Radikalen. Es unterstützt die antioxidative Wirkung des Glutathions, das ein entscheidender Bestandteil des im Auge konzentriert vorkommenden Enzyms Glutathionperoxidase ist. Die meisten Tierespezies vermögen Ascorbinsäure aus Glukose zu synthetisieren.

Der Mensch, Primaten und das Meerschweinchen sowie einige Vogelarten müssen Ascorbinsäure als Vitamin zuführen, weil die Enzyme D-Glucuronsäure- $\gamma$ -lacton-Reduktase, L-Gulonsäure- $\gamma$ -lacton-Oxidase und Aldonolactonase fehlen.

Die wichtigsten chemischen und biochemischen Eigenschaften des Vitamins beruhen auf der Endiolgruppierung. Durch Dissoziation der beiden H-Atome, der am Doppelbindungssystem sitzenden Hydroxylgruppen, reagiert Ascorbinsäure als zweibasische Säure ( $pK_1 = 4,1$  und  $pK_2 = 11,8$ ) und bildet entsprechende Salze.

Ascorbinsäure ist leicht autoxidabel und daher ein kräftiges Reduktionsmittel. Unter schonenden Bedingungen führt die Oxidation nur zu Dehydroascorbinsäure. Diese Verbindung ist nicht ionisierbar, ist also keine Säure. Sie hat volle Vitaminwirksamkeit, weil sie im Organismus, besonders durch nicht-enzymatische Reaktion mit Glutathion, wieder zu Ascorbinsäure reduziert werden kann. In neutralem und alkalischem Milieu wird der Lactonring der Dehydroascorbinsäure hydrolysiert und es entsteht 2,3-Diketogulonsäure, die keine Vitaminwirksamkeit mehr besitzt.



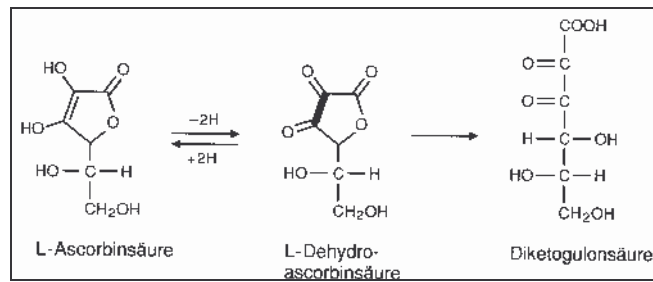


Abb.: 7 Ascorbinsäure

In trockenem Zustand sowie in saurer wässriger Lösung (< pH 6) ist Ascorbinsäure stabil, auch in Gegenwart von Luftsauerstoff. Bereits Spuren von Schwermetallen, besonders  $\text{Cu}^{++}$ , katalysieren jedoch eine rasche oxidative Zerstörung. Als Schutzstoffe vor Oxidation wirken bei Zimmertemperatur niedermolekulare SH-Verbindungen, verschiedene Säuren, Mono- und Polysaccharide, Pektine, Flavonoide, Gerbstoffe und andere. Von den organischen Säuren ist die Citronensäure besonders wirksam (noch bis pH 8); aus diesem Grund ist die Ascorbinsäure in Citrussäften besonders gut haltbar. Im Gegensatz zu den B-Vitaminen, deren Wirkformen definierte Coenzyme sind, gibt es bei der Ascorbinsäure keine besondere Wirkform. Für die Beteiligung von Ascorbinsäure als Cofaktor bei enzymatischen Reaktionen gibt es keine besondere Spezifität, vielfach können andere Reduktionsmittel Ascorbinsäure ersetzen. Über den Wirkungsmechanismus ist in der überwiegenden Zahl der Fälle nichts bekannt.

Die Rolle der Ascorbinsäure bei der Kollagensynthese wird mit dem Hauptsymptom des Skorbut, der gesteigerten Fragilität der Blutgefäße, in Zusammenhang gebracht. Im Ascorbinsäuremangel (Skorbut) ist die Hydroxylierung von Prolin und Lysin im Prokollagen zu Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin blockiert, ein Crosslinking kann nicht mehr stattfinden und es kommt zu den Folgen des Skorbut (Englard and Seifiter 1986, Forth, Wolfgang; Pharmakologie und Toxikologie. 1992).

Vitamin C regeneriert verbrauchtes Vitamin E und erhöht damit dessen Wirkung. Zusätzlich zur Wirkung als Antioxidans hat es eine besondere Bedeutung für den Diabetes mellitus und damit auch für die diabetische Retinopathie.

Es verringert nach Dietl (Dietl1999) die Glykosylierung der Proteine in Gefäßwänden der Kapillaren und damit deren Verengung. Vitamin C reduziert die Konzentration des aus Glukose in den Zellen gebildeten Sorbits. Der erhöhte Sorbitgehalt in den Zellen der

Linse führt zu einem erhöhten osmotischen Stress und steigert das Kataraktrisiko (Dietl/Arend 1999).

Bei Diabetikern und Rauchern ist der Vitamin C - Bedarf um ca. 50% erhöht. Dies ist eine Erklärung für das hohe Risiko von Diabetikern/Rauchern, an oxidationsabhängigen Augenleiden (Linsenerkrankungen, AMD, diabet. Retinopathie) zu erkranken (Biesalski 1997, Kaspar 1996).

#### **2.4.2 Konzentrationen in den verschiedenen Augenkompartmenten**

Nahezu alle Gewebe im Auge speichern Vitamin C, so dass man theoretisch annehmen kann, dass sie es benötigen (Rose et al 1998).

Vitamin C wird ins Kammerwasser sezerniert. Der normale Kammerwasserspiegel liegt bei 12-20 mg/100ml und ist damit ungefähr 25-mal höher als im Blutplasma (McLaren 1970). In der Netzhaut befinden sich noch viel höhere Vitamin C Konzentrationen als im Kammerwasser; sie betragen das über 100-fache des Serumspiegels (Knox et al 1961). Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie-Messungen zeigen einen Ascorbinsäuregehalt im Glaskörper von etwa 0,43 mmol/kg (McGahan 1985), womit man Messwerte, welche knapp 40 Jahre zuvor nachgewiesen wurden (Friedenwald et al 1944, Reddy and Kinsey 1960) bestätigte. Im Gegensatz zum Blutplasma ist der Vitamin C Gehalt des Corpus vitreum um das 9-fache höher. Man kann annehmen der Glaskörper werde durch aktives Sezernieren der Ascorbinsäure aus dem Epithel des Ciliarkörpers versorgt (Friedenwald et al 1944; Kinsey 1947).

Vermutlich herrscht ein hoher Vitamin C Gehalt im Glaskörper, um die Schäden durch das von der Linse durchgelassene UVA-Blaulicht zu reparieren (Ringvold 1980) und um für den Abbau der entstandenen freien Radikale zur Verfügung zu stehen (Balazs 1954). Auch die Arbeit von Altomare et al 1996 zeigt in der Linse und dem Glaskörper deutliche Unterschiede in der Vitamin C-Konzentration. Es wurden zusätzlich die Konzentrationsveränderungen bei Diabetikern, mit und ohne proliferative Veränderungen, und Nichtdiabetikern untersucht. Exakte Werte sind dem Artikel nicht zu entnehmen, aber die graphisch dargestellten Relationen machen einen Unterschied deutlich. Diabetiker, vor allem die mit proliferativen Veränderungen, weisen einen

deutlichen Vitamin C Mangel auf. Die Unterschiede zwischen Linse und Glaskörper innerhalb des Vitamin C Abfalls sind nicht zu definieren. In beiden Fällen findet man den niedrigsten Wert bei Diabetikern mit einer Retinopathie (Altomare et al 1996).

In Japan forschte man 1996 an den Veränderungen der Vitamin C-Konzentrationen im menschlichen Glaskörper, insbesondere bei verschiedenen diabetischen Komplikationen im Auge. Takano und sein Team veröffentlichten Daten zu Ascorbinsäurespiegeln im Glaskörper bei proliferativer diabetischer Retinopathie, der prolifer. Vitreoretinopathie, einer Makuladegeneration, einer prämakulären idiopathischen Fibrose und dem Terson-Syndrom. Neben den im Text erwähnten findet man in folgender Auflistung weitere Arbeiten über Vitamin C Spiegel in verschiedenen Augenabschnitten:

Mc Gahan 1985	GK Mensch	0,43 mmol/kg
Zhang et al 2001	GK Kaninchen	98,0-106 $\mu$ M
Rose et al 1997	GK Kaninchen	440 $\mu$ mol/l
	GK Rind	311 $\mu$ mol/l
	GK Ratte	24,5 $\mu$ mol/l
Brubaker et al 2000	Cornea Mensch	1,33 mg/gm feucht
Ringvold et al 2000	Cornea Mensch	0,22-1,56 mg/g
	KW Mensch	0,21mg/g
	Sklera Mensch	0,15 mg/g
	Konjunktiva Mensch	0,11 mg/g
	Tränendrüse Mensch	0,09 mg/g
	Blutserum Mensch	0,0008 mg/g
Bleau et al 1998	KW Mensch	1,48 mM
	KW Kaninchen	0,85 mM
	Plasma Mensch	0,025 mM
Takano et al 1997	GK Mensch bei PDR	120,9 $\mu$ g/ml
	GK Mensch bei PVR	129,8 $\mu$ g/ml
	GK Mensch bei AMD	311,5 $\mu$ g/ml
	GK Mensch bei ret. Fibrose	446,9 $\mu$ g/ml
	GK Mensch bei Terson	406, 0 $\mu$ g/ml

Abb. 8 Vitaminkonzentrationen in verschiedenen Augenabschnitten

### 2.4.3 Funktionen von Vitamin C bei Diabetes mellitus und im Auge

Bei Kataraktbildung sinkt der Vitamin C-Spiegel des humanen Kammerwassers ab (McLaren 1970). Dies scheint aber nicht die Ursache der Kataraktbildung zu sein, da bei Skorbut Katarakt nur wenig häufiger auftritt.

Möglicherweise hat Vitamin C doch einen antikataraktogenen Effekt im Sinne des Schutzes vor den schädlichen Folgen starker Lichteinstrahlung. Das Licht wirkt in Zusammenarbeit mit Sauerstoff und löst photochemische Reaktionen aus, die zur Bildung von Singulett-Sauerstoff, aktiven Radikalen und Peroxiden führen. Die Redoxfunktionen von Vitamin C und Vitamin E verhindern eine Schädigung durch diese chemisch stark aktiven Substanzen (Varma 1987; Lohmann 1987).

Viele Arbeiten in den letzten 10 Jahren weisen diesen antikataraktogenen Effekt nach, keiner von ihnen kann dieses Schutzphänomen allerdings physiologisch aufklären (Jacques et al. 1997; Hankinson et al. 1992; Vitale et al. 1993).

Diabetes mellitus erhöht oxidativen Stress, da hier vermehrt reaktive Sauerstoffintermediate gebildet werden. Diese entstehen einerseits aus einer ernährungsbedingten unzureichenden Versorgung und reduzierten Aufnahme von antioxidativen Vitaminen, zum anderen aus einem vermehrten Verbrauch antioxidativer Vitamine, wie dem Vitamin C. Daraus folgt, dass bei einem großen Teil der diabetischen Patienten die Plasmaspiegel an Vitaminen, u.a. Vitamin C, vermindert sind.

Der oxidative Stress ist eine Ursache für die Insulinresistenz, die den Typ 2 Diabetes charakterisiert. Die Translokation der insulinabhängigen Glukoseaufnahme wird durch reaktive Sauerstoffintermediate inhibiert, der Zusatz antioxidativ wirkender Vitamine hebt diesen Defekt wieder auf. Klinische Untersuchungen belegen eine verbesserte Glukosehämostase und Insulinsensitivität nach Gabe von antioxidativen Vitaminen.

Die reaktiven Sauerstoffintermediate sind eine Ursache für die Entwicklung der vaskulären Komplikationen beim Diabetes mellitus. Die Sauerstoffradikale führen über die Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren zu einer thrombogenen Aktivierung der Gefäßwand und zu einer Störung der endothelabhängigen Vasomotorik. Diese Störungen und Veränderungen bedingen langfristig in Abhängigkeit von der Lokalisation einen Umbau der Gefäßwand und der Strombahn. Aus zellbiologischen,

tierexperimentellen und pharmakologischen Untersuchungen folgt, dass hohe Dosen antioxidativer Vitamine gefäßprotektiv wirken. Epidemiologische Untersuchungen belegen eine inverse Korrelation zwischen der Aufnahme an antioxidativen Vitaminen und den kardiovaskulären Risiken (Rösen 1999).

Diabetiker weisen gegenüber Stoffwechselgesunden einen um mindestens 30% verminderten Vitamin C Spiegel auf (Will 1996).

Schon 1991 kann Sinclair nachweisen, dass Diabetiker mit mikroangiopathischen Veränderungen eine niedrigere Vitamin C Konzentration aufwiesen als die Kontrollgruppen, und dass im Blut nach Gabe von 1g Ascorbinsäure täglich die Ascorbinsäureplasmaspiegel bei Diabetikern in den ersten 3 Wochen ansteigen, dann aber in den folgenden 3 Wochen wieder abfallen. Dies lässt auf einen erhöhten oxidativen Stress schließen, der wiederum den vermehrten Vitamin C Verbrauch erklärt (Sinclair 1991). Eine weitere Erklärung liefert Cunningham (Cunningham 1998): Er stellt heraus, dass Insulin selber die Aufnahme von Vitamin C fördert, eine hyperglykämische Stoffwechsellage hingegen dies verhindert, so dass auch hier die Supplementierung von Ascorbinsäure empfohlen wird, um das Gewebe mit dem Vitamin zu versorgen und die physiologischen Funktionen aufrecht zu erhalten.

Dass Substanzen wie Vitamin C in dieses Geschehen protektiv eingreifen können, wurde mehrfach nachgewiesen: Ascorbinsäure führt bei Diabetikern selektiv eine endothelabhängige Vasodilatation herbei, während bei den stoffwechselgesunden Kontrollgruppen keine vergleichbaren Wirkungen erzielt wurden (Timimi et al 1998; Ting et al 1996).

## 2.5 Modell Schweineauge

Um die Ergebnisse mit dem menschlichen Auge gut vergleichen zu können, wurden Schweineaugen verwendet; diese kommen dem humanen Auge in Ausmaß und Form sehr nahe (Zeng et al 2001). Alle Dimensionen (Bulbuslänge, Vorderkammertiefe, Linsengröße, Bulbusvolumen, Glaskörpergröße und Netzhaut-Vaskularisation) sind mit dem menschlichen Auge direkt vergleichbar. Im Gegensatz zu den meisten Säugetieren besitzt das Schweineauge, ebenso wie das menschliche Auge, auch kein Tapetum lucidum, eine besondere Schicht der Choroidea, mit der eine Reflexion von nicht absorbierten Lichtstrahlen erfolgt (Zietschmann 1943). Experimente in der okulären Toxikologie werden insbesondere an Augen des Göttinger Minipigs gemacht. Hier ist das Modell des Schweineauges aus den oben genannten Gründen etabliert und dient für zahlreiche Versuche. Pournaras hat in seiner Arbeit am Modell des Minipigs experimentell einen retinalen Zentralvenenverschluss erzeugt und konnte durch diesen induzierten Verschluss die Folgeerscheinungen, die Neovaskularisationen, an der Netzhaut des Minipigs induzieren (Pournaras 1995). Weitergehend konnte er sogar den Effekt der Laserkoagulation bestätigen, womit die pathogenetischen und therapeutischen Schritte bei der Neovaskularisationsbildung im humanen und porcinen Auge vergleichbar wurden.

Die Verwendung von Schweineaugen als Modell bietet sich an, um die Messungen und damit Größenveränderungen von Glaskörperkollagen mit der dynamischen Lichtstreuung auch an einer dieser Spezies darstellen zu können.

Heute findet man neben den Arbeiten zu Glaskörperveränderungen im Rinderauge (Schmut u. Hofmann 1974) auch Arbeiten an Schweine – (Oliveira et al 2001) und Kaninchenaugen (Sakuma et al 2005).

Die in dieser Arbeit verwendeten Schweineaugen wurden morgens frisch aus dem Schlachthof in Köln abgeholt und noch am selben Vormittag präpariert.

## 2.6. Dynamische Lichtstreuung (DLS – Dynamic Light Scattering)

### 2.6.1 DLS – Überblick

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine Methode zur Messung der Grösse von suspendierten Partikeln im Bereich von 3 nm bis 3  $\mu\text{m}$ , welche in Flüssigkeit schweben sollten (Chu 1991). Thermische Bewegungen der Flüssigkeitsmoleküle führen unter den Partikeln zu einer Brownschen Molekularbewegung, so dass auf diese Teilchen treffendes monochromatisches Licht gestreut wird und eine Frequenzverschiebung relativ zur primären optischen Frequenz aufweist. Mittels der Photokorrelationsspektroskopie (PKS) wird durch eine geeignete experimentelle Versuchsanordnung das Spektrum des gestreuten Lichtes auf Intensitätsfluktuationen des Streusignals untersucht. Durch Berechnung einer Autokorrelationsfunktion der Intensitätsfluktuationen lassen sich Aussagen über physikalische Eigenschaften der Partikel treffen, wie z.B. Größe oder Molekulargewicht (Schulze 1996).

Mit der Dynamischen Lichtstreuung lassen sich die physikalischen Eigenschaften sofort, das heißt unmittelbar nach oder während der Messung, bestimmen. Die Meßmethode kommt mit verhältnismäßig geringen Mengen für einen Ansatz aus und ist weitgehend störungsunempfindlich (Schulze 1996).

Anwendungsbereiche erschließen sich z.B. bei biologischen und biomedizinischen Fragestellungen. Biologische Makromoleküle sind gewöhnlich hinreichend groß, um auch bei geringen Konzentrationen ausreichende Streulichtintensitäten zu bewirken. Es wurden z.B. Untersuchungen an lebenden Zellen und Viren durchgeführt und die Bewegungsgeschwindigkeit von Bakterien aus DLS-Messungen abgeleitet (Schulze 1996).

## 2.6.2 Physikalische Grundlagen

### Lichtstreuung

Unter Lichtstreuung (LS) versteht man die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit den atomaren Strukturen eines Streumediums (Schulze 1996).

### Dynamische Lichtstreuung

Mit der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird der Bereich der Lichtstreuung bezeichnet, der durch Messung der Frequenzverschiebung aufgrund thermischer Bewegung der Streupartikel Informationen über die Dynamik der Streupartikel ermöglicht (Schulze 1996).

Die Brown'sche Bewegung von Schwebeteilchen verursacht Signalschwankungen des Streulichts. Diese Intensitätsschwankungen werden gemessen durch das Zählen einzelner Photonen an einem Detektor und analysiert mittels eines Autokorrelators. Dieser berechnet die Ungleichheit der aufgenommenen Intensitätsschwankungen und ermittelt daraus eine Autokorrelationsfunktion (AKF).

### Autokorrelationsfunktion

Korrelationsfunktionen werden zum Charakterisieren dynamischer Systeme genutzt. Sie bieten ein sinnvolles Konzept bei der Beschreibung von stochastischen Prozessen.



Die Korrelationsfunktion zweier stochastischer Signale  $x(t)$  und  $y(t)$  ist definiert als:

$$C(\tau) = \langle x(t)x(t-\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t)y(t-\tau) dt \quad (1)$$

$C..$  = Autokorrelationsfunktion (AKF)

$\tau$  = Zeitdifferenz

$C(\tau)$  = AKF für verschiedene Zeitdifferenzen

$t$  = Zeitpunkt einer beliebigen Beobachtung, die komplette AKF wird aus sehr vielen einzelnen Beobachtungen ermittelt

$T$  = Anfangs- und Endzeitpunkt einer kompletten Messung, meistens setzt man jedoch den Anfangszeitpunkt auf Null, so daß  $T$  den Endzeitpunkt ergibt

$dt$  = Integration über Variable  $t$ .

Als Autokorrelationsfunktion (AKF) wird die Korrelation eines Signals mit sich selbst bezeichnet. Die entsprechende Gleichung lautet:

$$C(\tau) = \langle x(t)x(t-\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t)x(t-\tau) dt \quad (2)$$

Hieraus ergibt sich unmittelbar

$$C(\tau) = C(-\tau) \quad (3)$$

und mit

$$0 \leq (x(t) - x(t-\tau))^2 = x^2(t) - 2x(t)x(t-\tau) + x^2(t-\tau) \quad (4)$$

$$(x(t)x(t-\tau)) \leq \frac{1}{2} (x(t)^2 + x(t-\tau)^2) \Rightarrow [x(t)x(t-\tau)] \leq [x^2(t)] \quad (5)$$

$$\Rightarrow C(\tau) \leq C(0) = [x^2] \quad (6)$$

Für große Werte von  $\tau$  wird die statistische Abhängigkeit immer kleiner, so dass die AKF sich für  $\tau \rightarrow \infty$  asymptotisch dem Wert  $[x]^2$  nähert.

Dieser Wert wird Grundlinie (Baseline) genannt.

Die folgende Abb. zeigt den typischen Kurvenverlauf einer AKF.

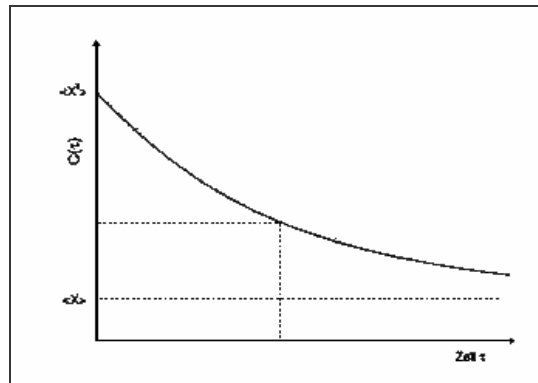


Abb.: 9: Die Autokorrelationsfunktion einer fluktuierenden Größe  $X(t)$ . Der Wert  $C(0) = \langle x^2 \rangle$  stellt für alle  $\tau$  eine obere Schranke dar. Der Verlauf kann als exponentieller Verlauf beschrieben werden und ist typisch für Experimente der DLS.

Bei realen Messungen mit einer hohen Zahl gleichgroßer Streupartikel gleichen die Intensitätsschwankungen des Streulichtes einer Gaußschen Verteilung und die entsprechende Autokorrelationsfunktion kann durch eine Exponentialfunktion der Form

$$C(t) = B + \beta \exp(-\Gamma t) \quad (7)$$

mit

$$\Gamma = 2Dq^2 \quad (8)$$

beschrieben werden, wobei  $B$  einen konstanten Basiswert darstellt, der gewöhnlich 1 beträgt und  $\beta$  dem dynamischen Anteil der Amplitude entspricht. Die Summe der beiden kann als Qualitätskontrolle für die Güte der AKF herangezogen werden. Sie sollte nahe dem Wert 2 liegen. Der Streuvektor  $q$  wird definiert als:

$$q = 4\pi n / \lambda \sin(\theta/2) \quad (9)$$

- $n$  = Brechungsindex
- $\lambda$  = Wellenlänge des Laserlichts
- $\theta$  = Streuwinkel

Der Diffusionskoeffizient  $D$  kann über die Stokes-Einstein'sche Gleichung mit dem hydrodynamischen Radius der suspendierten sphärischen Partikel in Verbindung gesetzt werden.

### Stokes-Einstein'sche Gleichung

Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist nach Einstein für unendlich verdünnte Lösungen gegeben durch:

$$D = k T / \xi \quad (10)$$

$k$  = Boltzmannkonstante

$T$  = Temperatur in Kelvin

$\xi$  = Reibungskoeffizient

Nach Stokes ist für Partikel mit einem Radius  $r$ , die sich in einer Flüssigkeit mit der Viskosität  $\eta$  bewegen, der Reibungskoeffizient  $\xi$  gegeben durch:

$$\xi = 6\pi\eta r \quad (11)$$

$\eta$  = Viskositätskoeffizient

$r$  = Radius

Eingesetzt in die Einstein'sche Formel ergibt sich die Stokes-Einstein'sche Gleichung:

$$D = kT / 6\pi\eta r \quad (12)$$

$k$  = Boltzmannkonstante

$T$  = Temperatur in Kelvin

$\xi$  = Reibungskoeffizient

$\eta$  = Viskositätskoeffizient

### 2.6.3 Messprinzip und Messapparatur

#### Überblick

Die im Allgemeinen für Lichtstreuungsuntersuchungen benötigten Elemente sind in der folgenden Abbildung wiedergegeben.



Abb. 10 Blockdiagramm der einzelnen Komponenten des DLS-Messplatzes (nach Pecora 1985).

In einer Arbeit von Dierks und Wegener 1998 wird das Prinzip der Grössenmessung von Linsenproteinen mittels dynamischer Lichtstreuung in-vivo erprobt und das Einsatzgebiet der DLS-Messung im Auge bestätigt (Dierks K et al 1998).

Die in dieser Arbeit benutzte Messapparatur ist in Abb. 11 schematisch und fotografisch dargestellt. Sie beinhaltet alle Komponenten, die zur Durchführung der Lichtstreuungsmessung und Signalaufbereitung notwendig sind. Sämtliche Bauteile befinden sich in einem Gehäuse. In dem Gehäusedeckel ist eine 50 x 50 mm große Klappe eingelassen, um ein einfaches Wechseln der Küvetten zu ermöglichen.

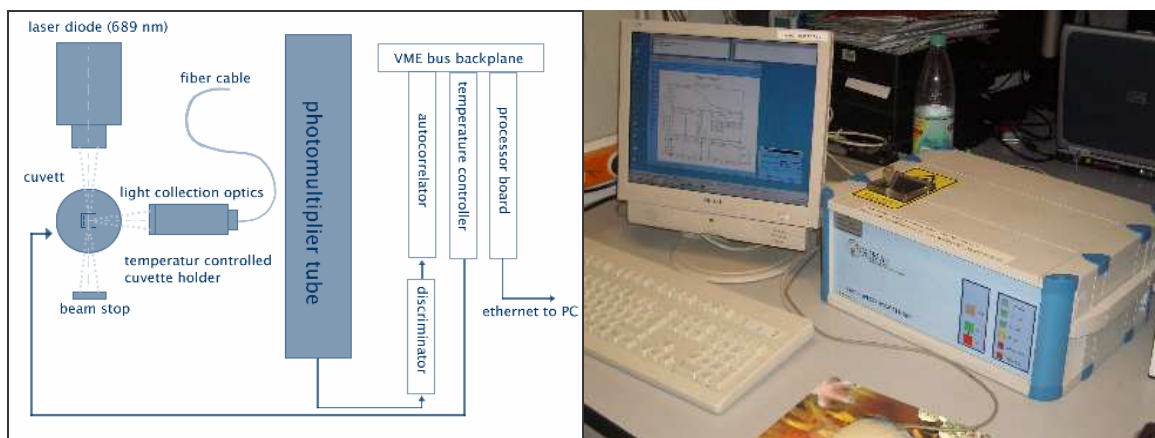


Abb.: 11: Messapparatur zur Durchführung von dynamischer Lichtstreuung. (von Dr. Dierks, Hamburg)

Im Folgenden werden die verwendeten Komponenten erläutert:

#### Halbleiterlaser:

Der primäre Lichtstrahl wird durch einen Halbleiterlaser erzeugt. Die Wellenlänge beträgt 689 nm bei einer Betriebstemperatur von 25° Celsius. Die Leistung der Laserdiode beträgt 30 mWatt. Der Laserkopf besteht aus einer speziellen Laserdiode mit Kollimatorlinsen.

#### Küvette und Messkopf:

Die Temperatur ist wählbar und für die Messapparatur auf 25° Celsius eingestellt. Die Integration des Temperaturverlaufs wird von einer elektronischen Schaltung gesteuert. Dadurch wird eine Temperaturstabilisierung der Küvette mit einer Genauigkeit von 0,1° Celsius erreicht. Die Küvette besteht aus Glas und hat einen Durchmesser von 1 cm. Am Ende eines unter der Küvettenhalterung befestigten Arms befindet sich ein elektronisch gesteuerter Messkopf. Das von dem Messkopf aufgefangene Streulicht wird von einer monomodalen Glasfaser zum Photomultiplier geleitet.

#### Photomultiplier:

Der Photomultiplier besteht aus einer 9-stufigen Röhre mit einem Durchmesser von 28 mm und besitzt eine Multialkali Photokathode mit einer 8 x 6 mm großen, lichtsensitiven Fläche. Das nutzbare Spektrum erstreckt sich vom ultravioletten bis zum infraroten Bereich (185 nm bis 900 nm). Der Photomultiplier besitzt eine hohe Quanteneffizienz von ca. 8% im Bereich der verwendeten Primärstrahlwellenlänge (689 nm).

#### Signalverarbeitung:

Das Ausgangssignal des Photomultipliers wird um den Faktor 100 auf ca. 40 mV verstärkt und zu einem Diskriminator geleitet. In diesem werden aus den verstärkten Spannungsimpulsen des Photomultipliers Standardimpulse generiert. Damit am Ausgang des Diskriminators ein Standardimpuls erzeugt wird, muss die verstärkte Signalspannung des Photomultipliers einen Schwellenwert von ca. 25mV übersteigen.

Datenakquisitions-System:

Es besteht aus einem Rechensystem mit digitalem Signalprozessor und einem Auswertungsrechner. Der Auswertungsrechner empfängt die gesendeten Autokorrelationsfunktionsdaten und berechnet daraus die Größenverteilung. Die empfangenen Daten und die berechneten Verteilungen werden gleichzeitig auf einem Bildschirm dargestellt, so dass die Messergebnisse bei noch laufender Messung visualisiert werden können.

Darstellung des Auswerteprogramms:

Die unten abgebildete Grafik zeigt in der oberen Reihe mit ACF beschriebene die Autokorrelationsfunktion (AKF, engl. ACF) aller empfangenen Datenpakete sowie die aus der Anpassungsrechnung von CONTIN resultierende AKF-Kurve. Die mittlere Kurve zeigt die errechnete Radiusverteilung. Unten links ist die Zählrate in kHz dargestellt, rechts wird die relative Standardabweichung wiedergegeben.

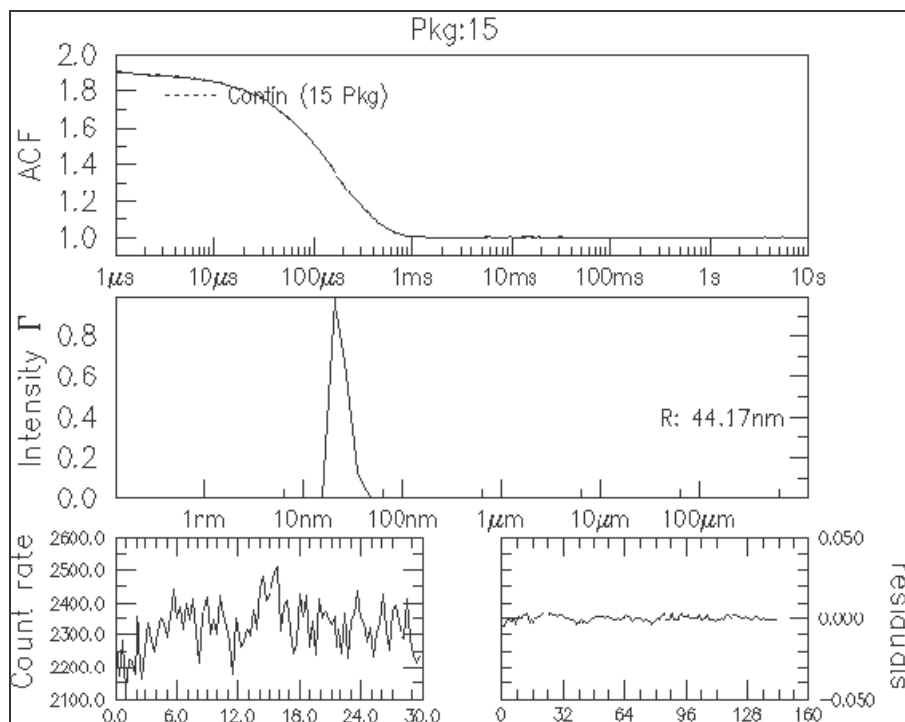


Abb. 12 Darstellung der einzelnen DLS-Messung.

Zur besseren Auswertung stellt der Computer nach allen durchgeführten Messungen ein Radiushistogramm auf, aus dem die einzelnen Werte abzulesen sind (siehe unten).

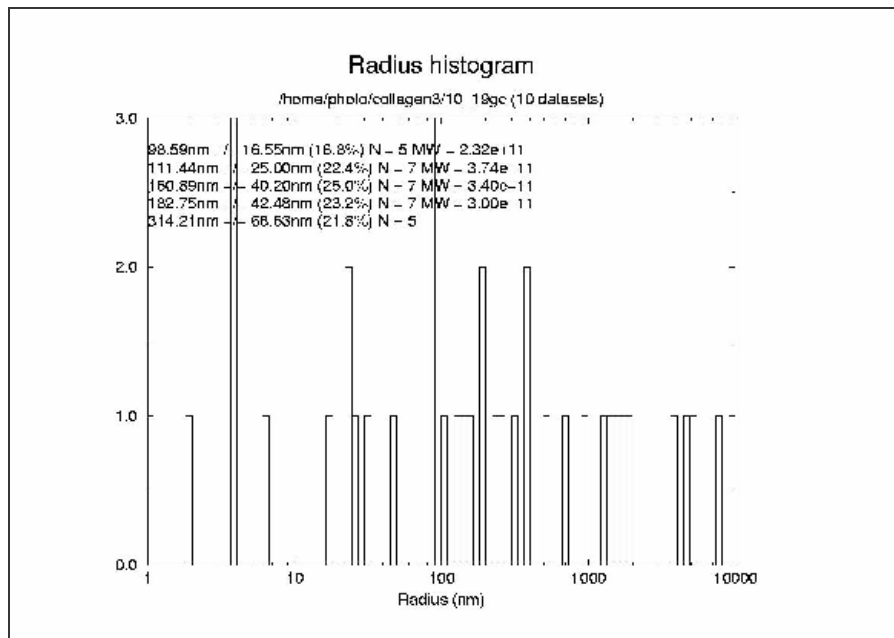


Abb. 13 Radiushistogramm der einzelnen DLS-Werte

Legt man zwei Kurven unterschiedlicher Radiuswerte übereinander kann ein Grössenunterschied auch grafisch dargestellt werden.

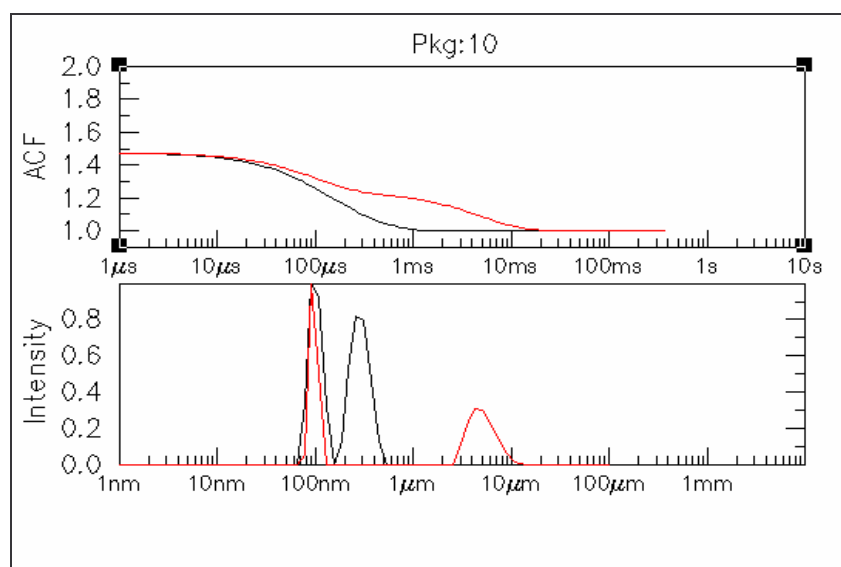


Abb. 14 Wertevergleichsdarstellung der DLS-Messung

### **3 Experimenteller Teil**

#### **3.1 Kollagenpräparation**

Etwa 1000 Schweineaugen wurden von der Fleischversorgung in Köln kurz nach der Schlachtung in mehreren Etappen abgeholt und auf Eis liegend nach Bonn in das Labor der experimentellen Ophthalmologie gebracht. Nach Entfernung peribulbärer Gewebereste wird eine zirkuläre 360°-Inzision der Sklera, ungefähr 4mm hinter dem Limbus äquatoriell durchgeführt. Die Sklera des hinteren Pols wird entfernt, der an der Linse und ihrem Halteapparat sitzende Glaskörper wird vorsichtig abgelöst und anschließend in 2-fach destilliertem Wasser gewaschen.

Bei Auffälligkeiten wie z.B. Katarakt oder bei Verunreinigung z.B. durch Berührung/Verletzung der Linse während der Präparation wird der Glaskörper verworfen. Die gesammelten Glaskörper werden alle homogenisiert. Das saubere Homogenat wird mit Azeton im Verhältnis 1:1 versetzt (Hofmann und Schmut 1974). Es bildet sich ein in Fäden anfallendes Hyaluronsäure-Kollagengemisch innerhalb der Flüssigkeit. Der in Fäden anfallende Rest des Kollagen-Hyaluronsäuregemischs wird abzentrifugiert und in Azeton gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet. Das getrocknete Präzipitat wird in 1 M NaCl-Lösung (1,0 g Präzipitat / 400ml NaCl-Lösung) suspendiert und 4 Stunden lang gerührt. Dabei geht die Hyaluronsäure in Lösung und das Kollagen bleibt ungelöst zurück (Schmut und Hofmann 1976). Nach einstündiger Zentrifugation mit 10000g wird der Überstand, in dem die Hyaluronsäure verbleibt, verworfen und die abgesetzten Kollagenfibrillen aus den Proberöhrchen zusammengebracht.

Das gesammelte Präzipitat stellt nun Glaskörperkollagen dar, wir erhalten aus ca. 1000 präparierten Augen 4g Kollagen.

Um das Kollagen einer Reaktion mit Glukose zugänglich zu machen, wird es mit Pepsin angedaut. Für diesen Schritt wird das Kollagen in 0,5 M Essigsäure suspendiert und Pepsin (Boehringer/Mannheim, Nr. 108057, 25000 U/mg) im Gewichtsverhältnis 1/5 (w/w) zugesetzt (Hofmann und Schmut 1977). Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden



bei 8° wird das Gemisch klarflüssig. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 3000g Geschwindigkeit bleibt das pepsin-angedaute Kollagen im Überstand erhalten. Durch Zusatz von festem NaCl (Endkonzentration: 4,4 M) kann man nun das Kollagen ausfällen (Stitt et al 1998). Das Salzgemisch wird über Nacht gerührt, um das Salz in Lösung zu bringen. Nach einstündiger Zentrifugation bei 32000g wird das gewonnene pepsin-gedaute Kollagen mit Azeton gewaschen, wir erhalten ein Feuchtgewicht von etwa 8g Kollagen. Um das Material besser auswiegen und lagern zu können, gefriertrocknen wir das pepsin-gedaute Kollagen. Als Endgewicht erhalten wir aus den anfänglich 1000 Schweineaugen 2,25g pepsin-gedautes Schweineglaskörperkollagen.

### **3.2 Probenansätze und Inkubationszeiten**

Es werden jeweils 5mg, 10 mg oder 20mg des pepsinangedauten Glaskörperkollagens in Eppendorfgläsern angesetzt. Der Probenansatz beinhaltet neben der Grundlösung aus 1ml Phosphat-Puffer-Lösung (PBS w/o Ca<sup>++</sup>+Mg<sup>++</sup>), zur Verhinderung eines Mikroben/Bakterienwachstums auch eine geringe Menge Natriumazid (0,02%). Diese Grundlösung wird mit unterschiedlichen Glukose- und Ascorbinsäurekonzentrationen versetzt. Drei verschiedene Glukosekonzentrationen (0 M, 0,2 M und 3 M) und vier verschiedene Ascorbinsäurekonzentrationen (0 mg/ml, 0,5 mg/ml, 5mg/ml und 10mg/ml) werden auf die Probenansätze verteilt.

Die Glukosekonzentrationen werden anhand der Vorarbeiten von Looke bestimmt, da in dieser Versuchsreihe nur die hohen Glukosekonzentrationen zu eindeutigen Ergebnissen führen (Looke 2003). Eine Probe mit etwa 10 mmol Glucosekonzentration pro Liter entspricht der Glukosekonzentration im Glaskörper eines insulinabhängigen Diabetikers (Lundquist und Österlin 1993). Ein Ansatz mit 24 mg Glukose/l, eine Konzentration, die bereits in verschiedenen Studien zur nicht-enzymatischen Glykosylierung von Kollagenstrukturen eingesetzt wurde (Kent et al 1985) (Bailey et al 1995), entspricht einer Konzentration von 133,3 mmol pro Liter. Wir wählen die Konzentrationsstufen 0M, 0,2M und 3M, um sicher eine Glykosylierungsreaktion zu erreichen.

Da bei Diabetikern ohnehin sehr geringe Vitamin C Konzentrationen vorliegen und durch die proliferativen diabetischen Veränderungen ebenfalls ein erhöhter Bedarf an

antioxidativen Hilfsmitteln besteht, entscheiden wir uns für die aufsteigende Konzentrationsreihe 0mg/ml; 0,5mg/ml, 5mg/ml und 10mg/ml Ascorbinsäurekonzentration in den Proben. Die 0,5mg/ml Konzentration entspricht in etwa der physiologischen Konzentration, was wir der Arbeit von Takano et al 1996 entnehmen konnten.

Die Probenbehältnisse/Eppendorfgefäße werden lichtgeschützt verpackt. Um der Autooxidation von Vitamin C entgegen zu wirken, werden die Proben anfangs nur mit 1ml gefüllt und in der Mitte der Inkubationszeit nochmals mit 1ml der entsprechenden Inkubationslösung befüllt.

Nachdem Looke zeigt, dass erst eine Inkubationszeit von mind. 8 Wochen Ergebnisse zeigt, werden in dieser Arbeit Inkubationszeiten von 2 + 3 Monaten festgelegt. Wir führen eine 0-Messung zur Ausgangsbestimmung, dann eine 2 Monatsmessung und eine 3 Monatsmessung durch. Eine Tabelle des Ansatz- und Inkubationschemas folgt im Anhang.

### **3.3 Messungen**

Zwischen dem 5.6.2002 und dem 8.6.2002 werden die 0-Messungen, d.h. die Ausgangsmessungen der Proben durchgeführt. Die Messungen werden bei Zimmertemperatur von 25°C im Labor Dierks & Partner in Hamburg durchgeführt. Auch die 2-Monatsmessung am 9.8.2002 und die 3-Monatsmessung am 9.9.2002 werden dort durchgeführt. Um noch weitere Messergebnisse nach dreimonatiger Inkubationszeit zu erhalten, werden auch einige der 2-Monatsproben nach 3 Monaten Inkubationszeit nochmals gemessen.

Wir veranschlagen eine Messzeit von 20 sec pro Messung. Bei nicht allen b-Proben (20mg Kollagen) kann eine Ausgangsmessung durchgeführt werden, wir nehmen aber an, dass sie ähnlich Ergebnisse wie die a-Proben ergäben. Zur Messung wird die Probe in eine Glasküvette umgefüllt. Anschließend wird eine 10 sec. Probemessung vorgenommen, bevor die eigentlichen Messungen, welche durch das angeschlossene PC-System selbständig durchgeführt werden, gestartet. Bei jedem Probenwechsel werden die Küvetten mit 2 fach destilliertem Wasser gesäubert, um Vermischungen der Proben zu verhindern. Die Messung wird über die PC-Oberfläche mitverfolgt.

## **4 Versuchsergebnisse**

### **4.1 Messung der Latexteilchen zur Bestimmung des Viskositätseinflusses**

Da die Viskosität der Flüssigkeiten, in denen die zu messenden Partikel schweben, linear in die Radiusberechnung eingeht, spricht dies deutlich für eine vorherige Bestimmung dieses Faktors, um Fehler die rein durch die Berechnung auftreten ausschließen zu können. Diese Abhängigkeit lässt sich aus der Formel 12 im Kapitel Physikalische Grundlagen der Dynamischen Lichtstreuung entnehmen.

Gerade bei den von uns verwendeten hochmolaren Glukoselösungen spielt der Viskositätsfaktor eine entscheidende Rolle in der Größenberechnung. Die Viskosität wird ebenfalls stark beeinflusst durch die Temperatur der Proben. Wenn man die Probentemperatur erhöht, verringert man damit die Viskosität und misst später einen vermeintlich kleineren Radius. Es gibt noch einen zweiten Grund, warum man vermeintlich kleinere Werte erhält. Durch Erwärmung wird nämlich ebenfalls die Brown'sche Molekularbewegung der einzelnen Teilchen erhöht und damit kommt es zu einer Verkleinerung der Messwerte. Um diesen Fehler bei der Messung zu vermeiden, wurden die Messungen alle bei einer Zimmertemperatur von 25° C durchgeführt.

Da die Viskositätsunterschiede der Zuckerlösungen makroskopisch auffielen, führten wir eine Viskositätsmessung der einzelnen Glukoselösungen durch.

Um diesen Viskositätsfaktor darzustellen, setzten wir Proben an, die zum einen die Grundlösung, also Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) mit den verschiedenen Konzentrationen von Glukose, nämlich 0 molare, 0,2 molare und die 3 molare Glukosekonzentration enthielten, zum anderen genormte Latex-Teilchen mit einer Größe von 100nm.

Bei der DLS-Messung der genormten Latex-Teilchen in den unterschiedlichen Flüssigkeiten erhielten wir folgende Ergebnisse.

Eine Messung in 2-fach destilliertem Wasser ergab genau einen Radius von 52,60 nm, sodass man von einer genauen Messung ausgehen kann. Die Größenmessungen in den entsprechenden Glukoselösungen mit dem Latex-Teilchen sind in der folgenden Tabelle protokolliert. Bei mathematischer Betrachtung kann man nun bei den höheren

Viskositäten auf einen Faktor kommen, der in der letzten Spalte aufgezeigt ist, der den etwaigen Vergrößerungsfaktor der Partikel durch erhöhte Viskosität widerspiegelt.

PBS + 0 M Glucose + Latex	66,03 nm	„Faktor 0“
PBS + 0,2 M Glucose + Latex	71,17 nm	Faktor 1,078
PBS + 3 M Glucose + Latex	237,97nm	Faktor 3,604

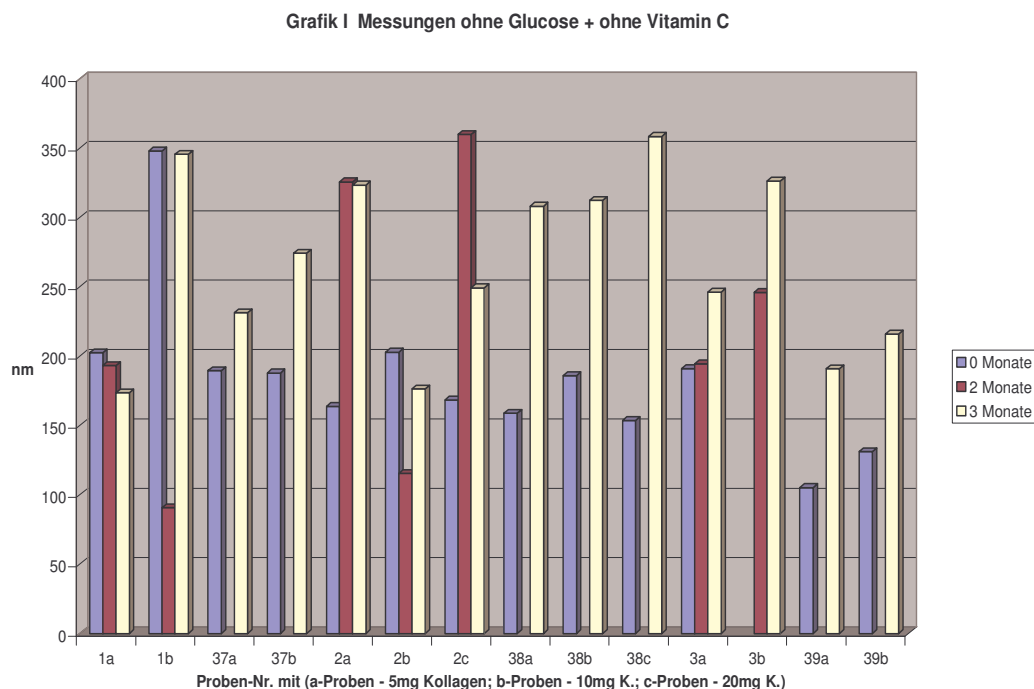
Durch ein ideal messbares und nicht zu beeinflussendes Latex-Teilchen kann man also den vermeintlichen Vergrößerungsfaktor der höheren Viskosität bestimmen. Diese Latexteilchenmessung zeigt, dass für die Anwendung am Menschen grosse Messreihen zur Viskosität des GKs in verschiedenen Altersklassen und Krankheitszuständen erforderlich sind, um Viskositäts – Korrekturfaktoren zu erhalten. Diese Messreihen könnten z.B. post mortem oder an Schweineauge durchgeführt werden.

## 4.2 Ergebnistabelle

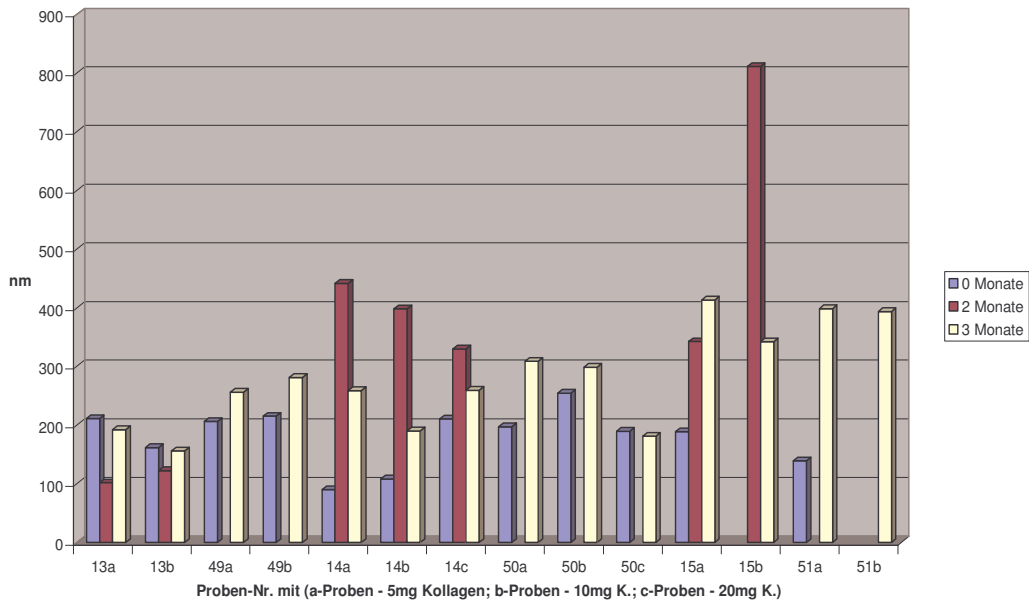
siehe Anhang

## 4.3 Ergebnisgrafiken

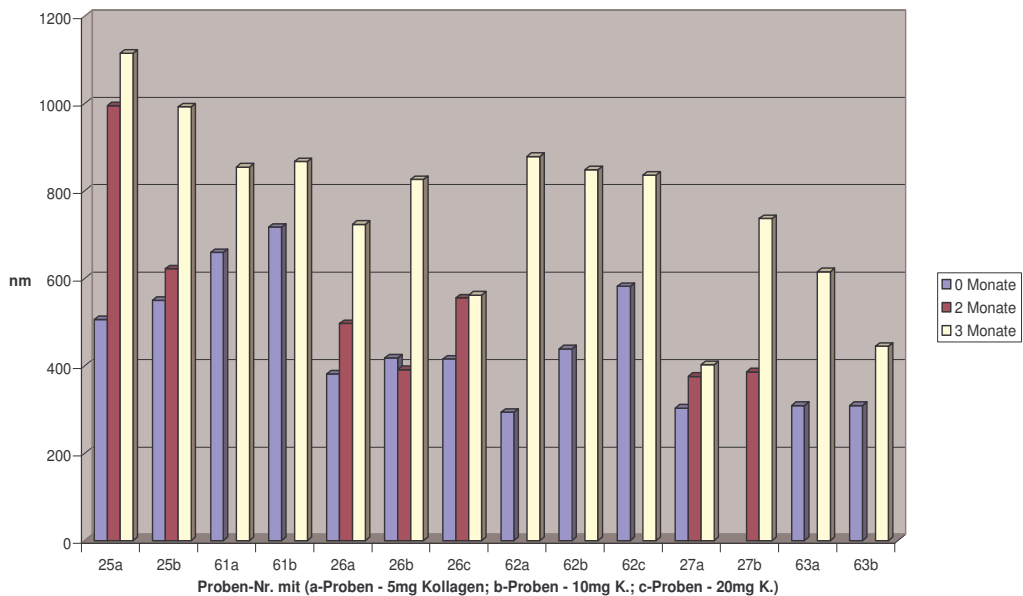
Erläuterungen der Grafiken im Text unter 4.4. Ergebniserläuterungen



Grafik II Messungen mit Glucose (0,2 M) + ohne Vitamin C



Grafik III Messungen mit Glucose (3 M) + ohne Vitamin C



#### 4.4 Ergebniserläuterungen

Die im Anhang dargestellte Ergebnistabelle zeigt alle Proben mit den dazugehörigen Messungen und den Messergebnissen. Der Inhalt der Proben ist im Schema der Probenansätze tabellarisch aufbereitet. a-Proben enthalten mit 5mg relativ wenig Kollagen, b-Proben 10mg und c-Proben mit 20 mg am meisten Kollagen in dieser Versuchsreihe. Die Proben 1-36 wurden nach der Ausgangsmessung erst wieder nach 2

Monaten, die Proben 37-72 teilweise nach 2 und gesamt nach 3 Monaten gemessen. Wie oben beschrieben, wurde auf die Ausgangsmessung einzelner b-Proben verzichtet, daher sind hier keine Werte eingetragen. Viele der Proben waren „nicht messbar“, dies fällt vor allem bei fast allen Proben mit Vitamin C Zusatz auf.

In Grafik I werden die Messungen der Proben ohne Glukose und ohne Vitamin C Zusatz dargestellt, d.h. es liegen Grössenwerte in Bezug zur Kollagenmenge und der Inkubationszeit vor. Es zeigt sich bei fast allen Proben eine Grössenzunahme über die Inkubationszeit von 3 Monaten. Insbesondere bei den c-Proben zeigt sich die Grössenveränderung in Abhängigkeit zur Kollagenkonzentration, welche hier bei glukosefreien Proben auf eine Verklumpung der Kollagenfibrillen zurückzuführen ist.

Grafik II stellt die Messungen in 0,2 M Glukoselösung ohne Vitamin C Zusatz dar. Es zeigt sich in den meisten Fällen eine Vergrösserung der gemessenen Kollagenfragmente, insbesondere bei Betrachtung der 3 Monatsmessungen im Vergleich zur Ausgangsmessung, die 2 Monatsmessungen zeigen teilweise grosse Ausreisser. Die Kollagenkonzentrationen machen in diesem Vergleich untereinander keine grossen Unterschiede.

Grafik III zeigt zunächst deutlich höhere Werte, welche auf die erhöhte Viskosität in dieser Glukoselösung (3M) zurückzuführen sind. Untereinander lassen sich die relativen Grössenunterschiede vergleichen, da alle Proben in der 3 M Lösung gemessen wurden. In allen Proben über die lange Inkubationszeit von 3 Monaten kommt es zu einer deutlichen Vergrösserung der Fragmente im Vergleich zum Ausgangswert, bei fast allen ist diese Vergrösserungstendenz schon nach 2 Monaten feststellbar. Im Verhältnis steigt die Vergrösserung aber deutlich mehr, umso länger das Kollagen in der Zuckerlösung verbleibt.

Die Messwerte nach Versuch der Vitreolyse mittels Vitamin C, also jene Proben die mit Vitamin C in unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt wurden, stellen keine reproduzierbaren Werte dar. Es ist daher nicht möglich aus diesen Werten eine Grafik zu erstellen, einzelne Werte sind in der im Anhang aufgeführten Tabelle ersichtlich.

Während der Messungen zeigte sich, dass das DLS System keine eindeutige Partikelgrösse bestimmen konnte. Die Spannweite der Messergebnisse liegt sehr weit auseinander, es zeigen sich sehr grosse Abweichungen, so dass die Messungen als nicht verwertbar bzw. nicht messbar bezeichnet werden. Das DLS System rechnet einen Mittelwert aus, der allerdings wegen der berechneten, weit grösseren Standardabweichung der Messung nicht aussagekräftig ist.

Es werden teilweise auch sehr grosse Partikel gemessen, bei denen nicht unterschieden werden kann, ob es sich um Verunreinigungen oder um grosse Kollagenklumpen handelt. Es zeigen sich aber keine eindeutigen Werte für Lyseprodukte, die gemessenen Werte sind daher nicht aussagekräftig.

Vergleicht man die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen, sieht man im Vergleich der Grafiken, dass der Grössenunterschied bei den Fragmenten in der konzentrierten Glukoselösung am meisten ansteigt.

Alle hier gemessenen Daten haben eine relativ hohe Streubreite. Diese ist bei den zu messenden Kollagenstrukturen zu erwarten und sollte mit der Inkubationsdauer und der Höhe der Glukosekonzentration zunehmen, da davon auszugehen ist, dass neben den verklumpt umherschwebenden Kollagenfragmenten auch sehr kleine oder gar keine Fragmente gemessen werden, d.h. umso inhomogener die Lösung mit der Zeit wird, desto grösser sollte die Streuung der Messwerte sein.

## **5 Diskussion der Versuche**

Der Diabetes mellitus gewinnt aufgrund seines zunehmend epidemieartigen Charakters grundsätzliche volkswirtschaftliche Bedeutung. War noch bis vor einigen Jahrzehnten ein Anteil von 5% der Bevölkerung von dieser familiär gehäuften Erkrankung betroffen, muss jetzt mit einem Anteil von 16% mit manifestem Diabetes mellitus gerechnet werden (Rathmann et al 2003). In den nächsten 3 Jahren wird sich dieser Anteil nach Schätzungen der WHO um weitere 25% erhöhen (Zimmet et al 2001). Die Erblindungsrate in Deutschland liegt bei 12,3/100.000 Einwohnern im Jahr, davon fallen ca. 1,7/100.000 Einwohnern ursächlich auf die diabetische Retinopathie. Insbesondere die erwerbsfähige Gesellschaft ist hier am meisten betroffen, denn die diabetische Retinopathie liegt als Erblindungsursache im Alter von 40-79 an erster Stelle (Bertram 2005). Die Spätfolgen des Diabetes mellitus mit ihren für den einzelnen Patienten oft schwerwiegenden Verläufen fordern dem Gesundheitssystem eine enorme Leistung ab. Die direkten Krankheitskosten, welche auf den Diabetes mellitus zurückzuführen sind, wurden von Janka und Kollegen (1998) auf mindestens 13 Milliarden Euro pro Jahr in Deutschland geschätzt. Um hier Lösungen zu finden, sind Früherkennung und Prävention der Grunderkrankung wichtig. Außerdem müssen die frühen Anzeichen der schwerwiegenden Folgeerkrankungen verstärkt für deren Prävention genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit ist versucht worden einerseits eine diagnostische Untersuchungsmöglichkeit zu etablieren, die klinisch einsetzbar und nicht invasiv frühe strukturelle Veränderungen im Glaskörper aufzeigen kann. Andererseits wird versucht, die pathologischen Veränderungen in einem frühen Stadium mittels der zu etablierenden Untersuchungsmethodik, der DLS-Methode zu analysieren. Darauf aufbauend ist ein schonender Ansatz zur Lyse von Kollagenaggregaten mittels Vitamin C untersucht worden. Die gemessenen Veränderungen am Glaskörperkollagen werden in der vorliegenden Arbeit in-vitro am Modell des Schweineauges aufgezeigt.

Das Glaskörperkollagen ist neben Hyaluronsäure und Wasser einer der Hauptbestandteile und Gerüst des Glaskörpers, es wird experimentell extrahiert und kann somit isoliert betrachtet werden. Insbesondere das Zusammenspiel von Kollagen



und Hyaluronsäure im Glaskörper ist höchst komplex und bisher nicht genug verstanden, so dass eine ideale Langzeittamponade für den Glaskörper nach operativer Glaskörperentfernung (Vitrektomie) noch nicht gefunden ist.

Das Schweineauge, als in-vitro Modell für diese Arbeit, bietet sich aus folgenden Gründen als Versuchsobjekt an.

Es liefert eine ausreichende Glaskörpermenge bei der Präparation. Schweineaugen sind leicht verfügbar und in ihren Ausmaßen direkt mit dem menschlichen Auge zu vergleichen. Physiologisch und in der biochemischen Zusammensetzung des Glaskörpers ist es dem humanen Auge sehr nahe (Zeng et al 2001). Des Weiteren ist das Schweineauge in der operativen Ophthalmologie ein bekanntes Modell, zahlreiche Operationstechniken werden am Schweineauge eingeübt. Viele pharmakologisch-toxische Studien und die Erprobung diagnostischer Verfahren werden heute am Auge des Minipigs untersucht. Untersuchungen zum Neovaskularisationsverhalten nach Gefäßverschlüssen am Modell des Minipigs zeigen die pathophysiologische Vergleichbarkeit der beiden Spezies (Pournaras 1995). Im Gegensatz zum Rinderauge, welches in vorherigen Versuchen als Modell diente, ist das Schweineauge nicht nur wegen seiner Grösse, sondern insbesondere auch wegen seiner anatomisch-histologischen Ähnlichkeit das bessere Modell. Das Schweineauge besitzt genauso wie das menschliche Auge kein Tapetum lucidum, eine reflektorische Zwischenschicht in der Netzhaut (Zietschmann 1943), welche das Rinderauge vom humanen Auge massgeblich unterscheidet.

Tanaka und Benedek haben 1975 als erste die methodische Anwendbarkeit der DLS Messungen im Bereich der Augen unter Beweis gestellt (Tanaka et al 1975). Es wurden Augenlinsen von Menschen und Rindern in vitro untersucht. Ziel der damaligen Arbeit war die Suche nach einem sensitiven und objektiven Nachweisverfahren für die Kataraktbildung. Eine vermehrte Aggregation der Linsenproteine bzw. eine Größenzunahme der einzelnen Linsenproteine konnte mit der DLS-Methode nachgewiesen werden. Fast 20 Jahre später entwickelten und verbesserten zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen (Ansari et al und Rovati et al 1995) die DLS-Instrumentarien so, dass sie in-vivo Messungen zur Untersuchung des Glaskörpers und der Augenlinse am Menschen durchführen konnten (Ansari und Suh 1996). Im Vergleich

zu den Untersuchungsergebnissen im vorderen Augenabschnitt waren die Messresultate im Glaskörperbereich sehr inhomogen. Drei bzw. vier Jahre später publizierten Sebag und Rovati mit ihren Arbeitsgruppen erneut Versuche, bei denen sie diabetische Glaskörperveränderungen direkt am Patienten mittels DLS aufzeigten (Sebag et al 1999, Rovati et al 1998), diese aber keiner Struktur zu ordnen konnten. Daher war es Ziel dieser Arbeit durch Wiederholung der Glaskörperuntersuchungen von Sebag und Rovati auf molekularer Ebene in einem in-vitro Modell differenziertere Erkenntnisse über die diabetischen Veränderungen des Glaskörpers zu gewinnen.

Der geringe Anteil an strukturellen Komponenten des Glaskörpers macht seine Untersuchbarkeit schwierig. Die im gesunden Zustand unsichtbare Materie des Glaskörpers ist kaum darstellbar, daher lassen sich primär die pathologischen Glaskörperveränderungen und nicht die physiologischen Veränderungen des Glaskörpers darstellen (Sebag 1997).

Untersucht man den Glaskörper mittels der direkten Ophthalmoskopie hat man nur eine sehr eingeschränkte Beurteilbarkeit, da kein Stereosehen möglich ist und nur ein sehr kleiner Ausschnitt beobachtet werden kann. Bei der indirekten Ophthalmoskopie hat man zwar Stereosehen am hinteren Pol, aber in der Peripherie ist diese Untersuchung aufgrund der dann elliptischen Pupille nicht mehr in Stereopsis möglich. Die Spaltlampenuntersuchung ermöglicht eine gute und einfache Untersuchbarkeit des vorderen Glaskörpers ohne jede Quantifizierbarkeit. Es sind bei guter Mitarbeit des Patienten kleinste Veränderungen (Blutungen, Zellen bei Entzündungsreaktionen) biomikroskopisch nachweisbar und z.B. auch fotografisch darzustellen. Mittels vorgehaltenen oder per Kontaktgel aufgesetzten Lupen ist auch eine Darstellung des mittleren und hinteren Glaskörpers möglich. Vorausgesetzt ist bei allen diesen Untersuchungen eine klare Hornhaut, eine klare Linse, eine ausreichende Mydriasis und eine adäquate Mitarbeit des Patienten. Betrachtet wird der Glaskörper bei diesen Spaltlampenuntersuchungen über eine indirekte Beleuchtung, ähnlich dem bekannten Tyndall Effekt, bei dem ein Beleuchtungs-Betrachtungswinkel von ca.  $90^\circ$  ideal ist. Um die Veränderungen im Glaskörper besser erkennen zu können, lässt man während dieser Biomikroskopie den Patienten das Auge bewegen, um eine Bewegung des Glaskörpers zu induzieren. Die Reproduzierbarkeit der Untersuchung ist bei den zuvor

aufgezählten Untersuchungen schlecht, da sie eine subjektive Positionierung des Messraumes im Auge durch den Untersucher voraussetzt.

Eine Diagnostik des Glaskörpers kann man mit dem Scanning Laser Ophthalmoskop (SLO) betreiben, mit dem allerdings lediglich Veränderungen wie der Weiss'sche Ring im praepapillären Bereich dargestellt werden können (Mainster 1982). Kleinere Strukturveränderungen sind mit dem SLO nicht darstellbar. Die heute in Deutschland am häufigsten durchgeführte Diagnostik des Glaskörpers ist die Sonografie, die auch dann gelingt wenn Medientrübungen (Linse, Hornhaut, Glaskörperblutungen) vorliegen. Allerdings ist durch die geringe Auflösung ( $150\mu\text{m}$ ) eine Darstellung von diskreten Veränderungen im GK ebenfalls nicht möglich und die Diagnostik daher sehr limitiert. Die Sonographie kann nur Echos an Grenzflächen darstellen und keine strukturellen Komponenten wie Kollagenaggregate, da diese, wenn überhaupt diffus streuen. Lediglich starke Einblutungen und deutliche GK-Verdichtungen und -Verflüssigung durch den Alterungsprozess können dargestellt werden (Oksala 1978). Die neueren, hochauflösenden Ultraschallköpfe mit 100 MHz können zwar deutliche bessere Abbildungen schaffen, haben aber nur eine Penetrationstiefe von 4-5 mm und reichen daher nicht in die Tiefe des Glaskörperaumes.

Mit dem OCT, der optischen Kohärenz Tomographie, ist erstmals auf Basis einer Kohärenzverschiebung des eingestrahlt Lichtes eine direkte Darstellung von mikroskopisch kleinen Veränderungen ( $10\mu\text{m}$ ) im Glaskörper möglich, sofern diese zu einer Kohärenzverschiebung führen. Die Untersuchungen werden von Medientrübungen beeinflusst, sind aber in sekundenschnelle durchführbar. Das

Hauptuntersuchungspotential liegt am hinteren Augenpol zur Beobachtung der vitreoretinalen Grenzfläche, einer Reflektionsfläche (Gaudric 1999) und damit in der Strukturauflösung der Retina. Die OCT Untersuchung kann im GK in erster Linie nur Membranen mittels der Kohärenzverschiebung an den Grenzflächen darstellen, Stränge oder Agglomerate nur bedingt. Frühe Veränderungen des Glaskörpers auf molekularer Ebene z.B. beim Diabetes mellitus darzustellen, ist nicht möglich.

Spektroskopische Untersuchungen des Glaskörpers, deren Aufzeichnungen und damit Quantifizierungen von Glaskörperveränderungen sind selten. Aguayo zeigte mittels der NMR-Methode, der Ausrichtung der Moleküle in einem magnetischen Feld, die Verflüssigung des Glaskörpers mittels Vitreolyse, es ist allerdings noch nicht gelungen,

die hintere Glaskörperabhebung mittels dieser NMR Methode darzustellen (Aguayo 1985). Diese Methode ist in ihrer Durchführung sehr teuer, dauert lange und bedarf einer sehr guten Mitarbeit des Patienten. Eine NMR Apparatur auf eine ophthalmologische Untersuchungseinheit zu konstruieren ist nicht möglich. Trotzdem bietet diese Methode die Möglichkeit, den Glaskörper in seinem ganzen Umfang zu analysieren, was den meisten anderen Methoden nicht gelingt, da sie nur Ausschnitte aufzeigen. Die Raman Spektroskopie kann auf biochemischer Ebene einzelne Moleküle nachweisen. Arbeiten über die Augenlinse bestätigen diese Methode, eine Weiterentwicklung liegt in der Verwendung von Infrarotlicht (Nie 1990), welches eine bessere Penetration durch Trübungen hat. Die Arbeiten von Nie und Sebag mittels eines Nd:YAG Lasers und der Spektroskopiemethode nach Raman zeigten diabetische Veränderungen im Glaskörper. Man konnte diese von Kontrollaugen unterscheiden, die aufgezeigten Veränderungen aber nicht genauer differenzieren (Sebag et Nie 1994), ebenso wiesen die beiden Autoren daraufhin, dass eine verfeinerte nicht invasive Methode zur in-vivo Untersuchung entwickelt werden müsse. Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine solche Methode. Mikroskopische Partikel bis zu einer Größe von 3 nm können analysiert werden. Voraussetzung ist, dass sie sich in einer wässrigen Suspension mit Brownscher Molekularbewegung befinden. Temperatur, Viskosität und ein refraktiver Index der Lösung müssen bekannt sein, um u.a. über die Stoke-Einstein'sche Gleichung den Partikelradius und deren Verteilung in der Lösung zu bestimmen. DLS Untersuchungen im Auge wurden insbesondere von Ansari und Sebag in den USA vorangetrieben. Man konnte eine höhere Sensitivität in der Früherkennung von Linsentrübungen im Vergleich zur Scheimpflugphotografie nachweisen, auch die Arbeiten am Glaskörper konnten in-vivo und in-vitro nicht nur Pathologien durch den Diabetes mellitus, sondern auch die bekannten Alterungsprozesse des Glaskörpers aufzeigen (Ansari RR et al 1998, Ansari RR et al 2001, Sebag J et al 1999). Das Prinzip der Scheimpflugphotografie und die Neuentwicklungen in der heutigen ophthalmologischen Diagnostik mittels der Pentacam<sup>®</sup> bieten eindrucksvolle Bilder und diagnostisch wertvolle Informationen, haben aber das Problem der begrenzten Eindringtiefe. Der vordere Glaskörper kann kaum noch dargestellt werden, die für die Vitreolyse und die pathologischen Veränderungen wichtigen posterioren Anteile sind mit der Scheimpflugphotografie aus optischen Gründen nicht darstellbar.

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) stellt demnach eine ideale Methode zur Früherkennung von Glaskörperveränderungen dar, die Voraussetzungen für einen in-vivo Einsatz werden erfüllt. DLS-Messapparaturen lassen sich mit dem Spaltlichtmikroskop koppeln und ermöglichen somit eine leicht durchführbare, nicht invasive Untersuchung im Rahmen des normalen klinischen Ablaufs. Die für die Messung benötigte Laserenergie ist äußerst gering, sodass auch eine Anwendung mit hohen Wiederholungszahlen an einem Patienten durchgeführt werden kann, ohne ein gesundheitliches Risiko eingehen zu müssen. Mit dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung ist es möglich, in Sekundenschnelle Molekülveränderungen von unbestimmten Partikeln in-vivo auch im Nanometerbereich zu erfassen. Die wichtigsten Faktoren wie Temperatur der Probe, in diesem Fall des Glaskörpers, lassen sich mittels der Körpertemperatur ermitteln, der refraktive Index des Glaskörpers verändert sich nicht. Der Einfluss der Glaskörperviskosität könnte durch Ermittlung von Korrekturfaktoren für die verschiedenen GK-Viskositäten rechnerisch ausgeglichen werden. Die Messung ist untersucherunabhängig und dauert mindestens 10 Sekunden. Die DLS Konstruktion auf einer Spaltlampe wäre eine ideale Messmethode, wenn die Reproduzierbarkeit sicher gestellt ist. Die Schwierigkeit besteht in der Positionierung und Repositionierung des zu messenden Probenabschnittes. Die DLS Messung könnte mit einer Mikropositionierungseinheit gekoppelt werden. Diese muss das zu scannende Feld auf x, y und z Achsen fest im Inneren des Auges definieren und den Scan bei der Verlaufsuntersuchung dort wieder messen lassen. Vorstellbar wäre eine DLS Einheit kombiniert mit einem SLO Gerät, welches die genaue Position im Raum anhand von z.B. retinalen Auffälligkeiten wie Gefäßaufzweigungen positioniert und während der Untersuchung stabil hält. Ähnlich könnte man sich auch eine Ultraschallüberwachung oder eine Fixationseinheit für den Patienten vorstellen. Mit einer parallel geschalteten Positionsüberwachung, auch „Eye Tracking“ genannt, können die Artefakte durch nicht zu unterdrückende Blicksakkaden ebenfalls ausgeschaltet werden. Ein „Eye Tracker“ registriert mittels spezieller Videokameras die Blickbewegungen des Patienten und könnte die DLS-Messeinheit entsprechend nachführen oder korrigieren.

Bei in-vitro Messungen ist die Probengröße gut beeinflussbar, je kleiner sie gewählt wird, desto genauer die Untersuchung, da die Gefahr der Verunreinigung mit anderen Partikeln erschwert wird. Beim Befüllen der Küvetten liegt es nahe, dass sich die Strömungsverhältnisse durch das Befüllen in einem kleinen Gefäss schneller beruhigen als in einem grossen Gefäss. Im Auge ist die Probengrösse durch das Scanfenster variierbar bzw. definierbar, insgesamt sollte der Scan Abschnitt aber auch sehr klein gewählt werden, um die Energie des Lasers so klein wie möglich zu halten. Der Probenraum sollte eine konstante Temperatur aufweisen, um eine stabile Messung auch bei langen Versuchsreihen zu gewährleisten.

In der vorliegenden Arbeit ist die Suspension nicht nur aus einer Pufferlösung zusammengesetzt, sondern besteht in einem Teil der Ansätze aus hochmolaren Zuckerlösungen. Diese weisen eine andere Viskosität auf, welche in der Grössenberechnung der Partikel berücksichtigt werden muss. Da sich die Viskosität von humanem Glaskörper mit dem Alter und auch durch verschiedene Systemerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus verändert, müssen in zukünftigen Versuchen Messreihen bearbeitet werden, die z.B. über die in dieser Arbeit verwendete Latexteilchenmessung den unterschiedlichen Viskositäten der Suspensionen Rechnung tragen. Die in dieser Arbeit enthaltene Bestimmung des Viskositätsfaktors der einzelnen Messmedien durch die Latexteilchenmessungen ist einerseits die Bestimmung des mathematischen Parameters, andererseits bestätigt diese, dass im Messmedium keine anderen Störgrössen die tatsächliche Messung des Kollagens beeinflussen.

Vergleicht man die Looke'schen Messungen mit denen dieser Arbeit fehlt die Validierung durch die Latexteilchenmessung. In der damaligen Messreihe fällt auf, dass die „Looke'sche“ Vergrösserung der Kollagenpartikel fast ausschliesslich in der hochmolaren Zuckerlösung nachzuweisen ist, innerhalb dieser hochmolaren Lösung die Inkubationszeit zwischen 2-12 Wochen aber nahezu keine Rolle spielte. Die Kollagengrössen in den niedrigmolaren Zuckerlösungen verändern sich kaum. Looke's Messungen über 12 Wochen zeigen im Gegensatz zu dieser Arbeit eben keinen Zeitfaktor, damit keinen deutlichen Grössenunterschied, ausser der rechnerischen Vergrösserung durch die Viscositätsunterschiede der Suspensionslösungen.

Gerade die Validierung der jetzigen Messungen über die Latexteilchen aufgrund der unterschiedlichen Viskositäten ermöglicht es, die damaligen Werte von Looke und die dieser Arbeit zu vergleichen. Eine direkte Bestimmung der Molekülgrößen ist über die Vergleichsmessungen der Latexteilchen so möglich und zeigt, dass die Werte der o-Messungen in etwa denen der Ausgangswerte der Looke'schen Arbeit entsprechen. Anhand einer Messreihe von verschiedenen Glaskörperaspiraten mit grössendefinierten Latexteilchen würde sich die Viskosität der verschiedenen Glaskörper ermitteln lassen, und man könnte eine Viskositätstabelle von verschiedenen Glaskörperproben für zukünftige in-vivo Messungen erstellen.

Eine Schwierigkeit der DLS Messung ist das Vorhandensein von „large scatter particles“, diese sehr grossen Teilchen kommen als Verunreinigung der Probe, als Staubpartikel oder als zu untersuchende Teilchen in der Suspension vor. Grosse Partikel haben eine deutlich trägere Bewegung, sie streuen deutlich mehr Licht und sollten daher in niedrigen Konzentrationen gemessen werden. Bei zu hohen Partikelkonzentrationen kommt es zu Interaktionen, die das Ergebnis verfälschen können. Ein 10 fach größerer Partikel zerstreut 1millionenfach mehr Licht, ein vorheriges Filtern der Lösungen auf „large scatter particles“ erscheint daher bei Analyseverfahren sinnvoll. In dieser grundlegenden Arbeit ist ein Filterschritt wenig sinnvoll, da er die gegebenenfalls gesuchten Partikel abfiltrierte. Bei in-vivo Messungen würden alle im Glaskörper befindlichen Teilchen gemessen, die Variation der Partikel wird abhängig vom Zustand des Auges entsprechend hoch sein. Probleme werden bei Messungen entzündeter Augen (Uveitis mit Zellen im Glaskörper) oder eingebluteter Augen auftreten. Auch in den GK übergetretenes Pigment, z.B. nach rhegmatogenen Netzhautablösungen führt zu Abweichungen von den Normwerten und sollte bei in-vivo Messungen in Betracht gezogen werden.

Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Möglichkeit, mittels DLS nicht-enzymatische Glykosylierung von Glaskörperkollagen zu messen.

Die Eingangsmessungen aller Proben zeigen grösstenteils Werte zwischen 100 und 200nm, bei den hochviskösen Zuckerlösungen ist der mittels der Latexteilchenmessung ermittelte Bereinigungsfaktor anzuwenden. Diese Partikelgrösse wird schon in den Arbeiten von Looke erwähnt und entspricht den Vorergebnissen (Looke 2003). Kollagen



des Schweineglaskörpers, welches durch Pepsinandaueung fraktioniert wurde, lässt sich mit dem des Rindes vergleichen und mittels DLS messen.

Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen „Kollagen ohne Glucose und ohne Vitamin C“, welche über 2 und 3 Monate gemessen wurden, zeigen eine Radiusvergrößerung insbesondere bei den Messungen nach 3 Monaten. Diese Verdickungstendenz des Kollagens entspricht den fotografischen Arbeiten von Sebag über die Glaskörperveränderungen im Alterungsprozess. Diese Versuchsreihe stellt die Sebag'schen Erkenntnisse erstmals auf molekularer Ebene nach.

Bei den Messergebnissen der Versuchsreihen „Kollagen mit Glukose“ zeigt sich, dass die Radiuswerte mit ansteigender Glukosekonzentration und ansteigender Inkubationsdauer zunehmen, insbesondere die Werte in der 3 molaren Zuckerlösung zeigen bei der 3 Monatsmessung überwiegend eine deutliche Zunahme des Radiuswertes, unabhängig von der methodisch bedingten Vergrößerung durch die erhöhte Viskosität. Die DLS Messung von glukoseabhängigen Veränderungen des Glaskörperkollagens von Schweinen wird durch diese Arbeit bestätigt und durch die Latexteilchenmessung der unterschiedlichen Viskositäten verbessert.

Die Schwankungsbreite der Werte in den Messungen ist aufgrund der methodischen Kollagenandaueung durch Pepsin erklärbar. Die Kollagenveränderungen entsprechen den vermehrten Vernetzungen und Verdickungen, die bei den Kollagenfibrillen des diabetischen Glaskörpers elektronenmikroskopisch gefunden werden konnten.

In allen Messreihen scheint es unabhängig zu sein, wie viel Kollagen in den Proben vorhanden ist, damit scheinen die wichtigsten Parameter für die Veränderungen des Glaskörperkollagens in-vitro zum einen die Inkubationsdauer und zum anderen die Konzentration der Zuckerlösung zu sein. Übertragen auf die Pathogenese der proliferativen Vitreoretinopathie bestätigt dies die Auffassung, dass eine langjährige Hyperglykämie zu zerstörerischen Veränderungen im Glaskörper des Auges, aber auch an anderen Organen führt.

Die Möglichkeit, frühe diabetische Molekülveränderungen in-vivo sichtbar und messbar zu machen, ist neu. Eine frühe Diagnose von diabetischen Folgeerkrankungen anhand von in-vivo durchgeführten Messungen des Glaskörperkollagens könnte zukünftig Therapieoptionen eröffnen. Mittels der dynamischen Lichtstreuung können diese anhand der molekularen Strukturveränderungen kontrolliert werden.



Der therapeutische Ansatz dieser Arbeit, die nachgewiesene glukoseabhängige Grössenveränderung des Kollagens zu beeinflussen, ist gelungen. Der Zusatz von Ascorbinsäure in die Proben führt zu Veränderungen in der DLS Messung. Die Veränderung in den DLS Messungen ist unabhängig von der Kollagenmenge, unabhängig von der Ascorbinsäurekonzentration, unabhängig von der Inkubationsdauer und unabhängig vom Vorhandensein von Glukose. Es scheint als würde Ascorbinsäure eine Reaktion mit den Kollagenfragmenten der Suspension eingehen. Die Kollagenfragmente, die zuvor teilweise noch durch Glukose bei bis zu 3 monatiger Inkubation eine radiäre Vergrösserung zeigten, sind unter den nun veränderten Gegebenheiten unter Ascorbinsäure nicht mehr nachweisbar. Eine Reaktion verursacht die Auflösung der Kollagenpartikel. Diese Auflösung der Partikel erfolgt allerdings in dieser Arbeit unkontrolliert, es schwimmen zufällig verteilte, vermutlich grössere, (noch) nicht aufgelöste Kollagenstücke zusammen mit Staub und Schmutzpartikeln herum, die als Störpotentiale gewertet werden müssen. Die Ausgangsmessungen der mit Vitamin C versetzten Kollagenproben zeigen aber keine Abweichung von den anderen Vitamin C freien Proben, so dass eine Reaktion von Ascorbinsäure mit Kollagen zu der neuen Probenbeschaffenheit geführt haben muss.

Ähnlich den in-vivo Messungen von Sebag und Ansari zwischen 1998 und 2001 am Glaskörper konnten wir jetzt in-vitro mit der DLS Messung Veränderungen einzelner Strukturen, des Glaskörperkollagens durch die Beimischung von Ascorbinsäure, nachweisen. Die therapeutischen Versuchsergebnisse haben aber auch gezeigt, dass noch mehr Grundlagenforschung notwendig ist, um die Ergebnisse der Messungen mit den bestimmten Molekülveränderungen des Glaskörperkollagens korrelieren zu können. Analog den Arbeiten von Schmut und Hofmann (Schmut et Hofman 1974) zur Veränderung der Hyaluronsäure durch Ascorbinsäure kann in dieser Arbeit zumindest die Veränderung der Kollagenstruktur dargestellt werden. In-vivo Versuche zur Darstellung der Veränderungen der gesamten Glaskörperstruktur durch Vitamin C könnten einen synergistischen Effekt zeigen.

Die heutigen Projekte der pharmakologischen Vitreolyse beschäftigen sich hauptsächlich mit der hinteren Glaskörperabhebung, die zurzeit noch durch eine mechanisch operative Trennung der Schichten Glaskörpergrenzmembran und Netzhaut

durchgeführt wird. Eine vollständige Trennung der Schichten ist durch diese Methode allerdings nicht möglich. Da aber eine inkomplette hintere Glaskörperabhebung und damit eine bestehende Verbindung von Netzhaut mit dem Glaskörperkortex zu einer deutlichen Progression der meisten Netzhauterkrankungen wie z.B. der diabetischen Vitreoretinopathie und Makulopathie führt, ist das Hauptziel die primäre und vollständige hintere Glaskörperabhebung. Diese Spaltbildung ist nicht nur bei der Verhinderung der Progression der Erkrankungen wichtig, sondern würde bei der vitreoretinalen Chirurgie die Komplikationsrate durch Vereinfachung der Operationstechniken deutlich senken. Die pharmakologischen Substanzen, die bisher in der Literatur zu finden sind, haben alle eine enzymatische Wirkung und fallen daher in die Gruppe der enzymatischen Vitreolyse, im Bereich der pharmakologischen Vitreolyse auf nicht-enzymatischer Basis gibt es bisher außer Versuchsberichten keine Studien.

Die enzymatischen Substanzklassen sind Chondroitinase, welches eine Glaskörperabhebung in tierischen Modellen gezeigt hat, Hyaluronidase zur Glaskörperverflüssigung und Dispase zur Glaskörperabhebung. Bei Dispase zeigten sich allerdings innere Netzhautschäden.

Das Mittel der Wahl scheint Plasmin/Mikroplasmin zu sein. Dieses Enzym löst eine Glaskörperabhebung aus und bewirkt in hohen Dosen über eine Induktion der Matrix Metalloproteinasen eine Glaskörperverflüssigung (Gandorfer 2007). Der Nachweis dieser enzymatischen Glaskörperabhebung wird über die Elektronenmikroskopie der vitreoretinalen Grenzschicht geführt, ist aber in-vivo nicht darstellbar. Die zur Verflüssigung des Glaskörpers induzierten Matrix Metalloproteinasen können in hohen Dosen auch zu Netzhautschäden führen.

Dies legt die Überlegung nahe einen Substanzcocktail zu entwickeln, der die verschiedenen Aspekte der pharmakologischen Vitreolyse beachtet und gleichzeitig weder toxisch für die Netzhaut ist, noch Trübungen des Glaskörpers verstärkt oder induziert. Es erscheint sinnvoll, einem solchen Vitreolysecocktail, neben den enzymatisch und toxisch wirkenden Substanzen, auch retinaprotektive Substanzen, beizumengen, um z.B. freie Sauerstoffradikale zu binden. Vitamin C würde sich mit seinen Eigenschaften den Glaskörper zu verflüssigen und der bekannten Eigenschaft als freier Radikalfänger hier besonders anbieten.

Im Hinblick auf die zukünftige Anwendung der Erkenntnisse dieser Arbeit lässt sich resümieren, dass es gelungen ist, eine nicht-invasive Darstellung von frühen, präklinischen Veränderungen im diabetischen Glaskörper mit Sicherheit nachweisen zu können und damit auch Veränderungen im Verlauf darzustellen, was die Möglichkeit einer Therapieüberwachung wie z.B. der pharmakologischen Vitreolyse ermöglicht. Das in dieser Arbeit verwendete DLS-System sollte dann zur besseren Reproduzierbarkeit eventuell mit einem SLO Gerät zur Mikropositionierung im Auge kombiniert werden. Mit dem Antioxidans Ascorbinsäure steht eine weitere Substanz zur Veränderung der Glaskörperstruktur im Auge zur Verfügung. Weitergehende Grundlagenforschung muss die Korrelation zwischen diesen Messergebnissen und den molekularen Veränderungen der Kollagenstruktur zeigen. Ebenso muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden, in wieweit die Aggregationsgrösse der Kollagen-Moleküle die Angreifbarkeit durch Vitamin C oder andere Lyse-Cocktails beeinflusst. Die sehr unterschiedlichen Ergebnisse der Molekülgrössenmessung in den Vitamin C Proben deutet darauf hin, dass vielleicht nur kleine und mittlere Aggregate aufgelöst werden können, die grösseren Aggregate jedoch nicht.

Zukünftig wäre es wünschenswert, einen Vitreolysecocktail zur Verfügung zu haben, um die verheerenden Folgen der diabetischen Vitreoretinopathie und traktiver Netzhauterkrankungen durch eine intravitreale Medikamentenapplikation behandeln zu können. Bei der teils schwierigen Durchführbarkeit von Vitrektomien durch Membranbildungen im vitreoretinalen Grenzgebiet wäre die Vereinfachung durch vitreolyse-assistierte Operationsverfahren eine Weiterentwicklung in der vitreoretinalen Chirurgie.

Da Früherkennung der diabetischen Erkrankung immer schon im Feld der Ophthalmologie verankert war, wäre die Möglichkeit, über das DLS Modell eine frühzeitige Veränderung auf molekularbiologischer Ebene und damit die Progression der Erkrankung festzustellen, auch für die interdisziplinäre Behandlung des Patienten von Interesse.

## **6 Zusammenfassung**

Die Folgeerkrankungen durch Diabetes mellitus sind durch die derzeitige demografische Altersentwicklung der Bevölkerung bei gleichzeitigem Anstieg von Problemen wie Adipositas und Bewegungsarmut in den Konsumgesellschaften ein deutlich ansteigender Kostenfaktor in der Gesundheitsökonomie. Die diabetische Retinopathie ist auch heute noch in den westlichen Industrienationen die häufigste Erblindungsursache der Altersgruppe zwischen 20 und 74 Jahren. Insgesamt ist das Risiko, dass Diabetiker erblinden, 10 bis 20mal höher als bei nicht betroffenen Patienten. Nur eine geeignete Früherkennung und die Weiterentwicklung von frühzeitigen Therapieansätzen wird die globale Erblindungsursache verringern können. Die Beteiligung des Glaskörpers an der diabetischen Retinopathie (diabetische Vitreopathie), die hauptsächlich durch die nicht-enzymatische Glykosylierung des Glaskörpers zu entstehen scheint, ist schon in frühen Stadien der Krankheit und vor dem Auftreten der bekannten Netzhautschäden vorhanden. Die dynamische Lichtstreuung (DLS) hat sich als nicht-invasive Messmethode von Grössenveränderungen im Nanometerbereich als hilfreich herausgestellt und für den klinischen Gebrauch empfohlen.

Diese Arbeit konnte am Kollagen des Schweineglaskörpers nach Vorarbeiten mit Rinderglaskörper die Molekülveränderungen durch die nicht-enzymatische Glykosylierung mittels DLS-Technik an einer neuen Spezies bestätigen. In dieser Arbeit konnte die Grössendarstellung im Vergleich zu normierten Latexteilchen aufgezeigt werden. Bei dem Versuch, die Beschaffenheit des Glaskörpers mittels biochemischer Substanzen zu beeinflussen, haben wir uns für Vitamin C (Ascorbinsäure) als vitreolytische Substanz entschieden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich das zuvor in Glukoselösung inkubierte Kollagen bei Zugabe von Ascorbinsäure nicht mehr messen lässt.

Die Erkenntnis, dass die Glaskörperstruktur durch Vitamin C beeinflusst werden kann, ist viel versprechend in der Frage nach einer pharmakologischen Vitreolyse. Für die Zukunft wird es wichtig sein, welche Nebenwirkungen solche biochemischen

Substanzen im Auge hervorrufen, und welcher Substanzcocktail die gewünschte Wirkung im Glaskörper erreicht, um Glaskörperveränderungen frühzeitig zu beeinflussen. Diese Studie reiht sich als Grundlagen- und Methodearbeit in die heutige Diskussion der intravitrealen Medikamenteneingaben ein und bringt eine Substanzklasse - die Antioxidanzien - wieder in den Spiegel der Öffentlichkeit. Die DLS-Technik ist ein Verfahren, das im normalen klinischen Alltag des Augenarztes eingesetzt, frühzeitige Veränderungen des Glaskörpers erkennen kann und hierdurch nicht nur diabetische, sondern auch altersbedingte Veränderungen aufdecken könnte. Durch die Möglichkeit den Glaskörper durch intravitreale Substanzen zu verändern, ist es vorstellbar, traktive Netzhautlöcher sowie Netzhautablösungen zu vermeiden, auch Leitschienen für diabetische Neovaskularisationen zu minimieren und das Komplikationsrisiko einer Vitrektomie zu verringern.

### **Summary**

Diabetes is today one of the main demographic problems. Especially the following health problems of this epidemic like disease become an rising economical problem in the near future. The diabetic retinopathy is one of the most frequent causes of blindness in the developed world in an age range between 20-74 years. Particularly an early diagnosis is helping to avoid blindness in the employable age.

The vitreous body is affected by the diabetic disease and modifies his structure by diabetic influence.

With dynamic light scattering (DLS) this structural changes are detectable and measurable. This in-vitro experiment shows diabetic changes in porcine vitreous collagen by non enzymatic glycation by exposing the collagen 1 to 3 months to high glucose concentration.

The DLS method to measure vitreous changes, was evaluated in the porcine eye model. Additionally this experiment shows that it is possible to modify vitreous structure by ascorbic acid and detect these structural changes with the DLS method.

DLS offers a suitable method to monitor a therapy of vitreous, for example inducing a pharmacologic vitreolysis.

## **7 Literaturverzeichnis**

Aguayo J, Glaser B, Mildvan A, Cheng HM, Gonzales RG, Brady T 1985: Study of vitreous liquefaction by NMR spectroscopy and imaging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 692

Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, Micelli-Ferrari T, Signorile A, Cardia L 1997: Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *European Journal of Clinical Investigation* 27:141-147

Ansari RR, Suh KI, DellaVecchia MA, Dubin S 1995: Ophthalmic Diagnostics Using a New Dynamic Light Scattering Fiber Optic Probe. NASA Technical Memorandum 107049

Ansari RR, Suh KI, DellaVecchia MA, Dubin S 1996: Three-dimensional scanning of eye (lens and vitreous) using a newly developed dynamic light scattering probe. To be presented at BIOS-96, SPIE, Jan. 27-Feb., San Jose, CA.

Ansari RR, Datiles MB III, King JF 1998: Measuring lens opacity: Combining quasi-elastic light scattering with Scheimpflug imaging system. *SPIE* 3246:35

Ansari RR, Suh K, Dunker S, Kitaya N, Sebag J 2001: Quantitative molecular characterization of bovine vitreous and lens with non-invasive dynamic light scattering. *Exp Eye Res* 73: 859–866

Bailey AJ, Sims TJ, Avery NC, Halligan EP 1995: Non-enzymic glycation of fibrous collagen: reaction products of glucose and ribose. *Biochem J* 305: 385-390.

Balazs EA 1954: Studies on structure of vitreous body: Absorption of ultraviolet light. *Am J Ophthalmol* 38: 21

Balazs EA, Flood MT 1978: Age related changes in the physical and chemical state of human vitreous. Third international Congress for Eye Research. Osaka. Japan

Balazs EA, Toth LZ, Ozanics V 1980: Cytological studies on the developing vitreous as related to the hyaloid vessel system. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 213: 71-85

Bertram B 2005: Blindheit und Sehbehinderung in Deutschland: Ursachen und Häufigkeit. *Augenarzt* 6: 267-268

Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß HE 1997 *Vitamine*. Stuttgart, New York

Bleau G, Giasson C, Brunette I 1998: Measurement of hydrogen peroxide in biological samples containing high levels of ascorbic acid. *Analytical Biochemistry* 263: 13-17

Brubaker RF, Bourne WM, Bachman LA, McLaren JW 2000: Ascorbic Acid Content of Human Corneal Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 1681-1683

Brownlee M 1989: The role of non-enzymatic glycosylation in the pathogenesis of diabetic angiopathy. In: *Complications of Diabetes mellitus* ( Draznim B, Melmed S, LeRoith D, eds ) Riss AR, New York 9-17

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H 1988: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *New Engl J Med* 318: 1315-1321

Buckingham B, Reiser KM 1990: Relationship between the content of the lysyl oxidase-dependent crosslinks in skin collagen, nonenzymatic glycosylation and longterm complications of type I diabetes mellitus. *J Clin Invest* 86: 1046-1054

Caruelle D, Groux-Muscattelli B, Gaudric A, Sestier C, Coscas G, Caruelle JP, Barritault D 1989: Immunological study of acidic fibroblast growth factor (aFGF) distribution in the eye. *J Cell Biochem.* 39: 117-28.

Charteris DG, Hiscott P, Grierson I, Lightman SL 1992: Proliferative vitreoretinopathy. Lymphocytes in epiretinal membranes. *Ophthalmology*. 99: 1364-7.

Choudhury P, Chen W, Hunt RC 1997: Production of platelet-derived growth factor by interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta-stimulated retinal pigment epithelial cells leads to contraction of collagen gels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 824-33.

Christiansson J 1958: Changes in mucopolysaccharides during alloxan diabetes in the rabbit. *Acta Ophthalmol* 36: 141-162

Chu B 1991: „Laser light scattering: Basic Principles and Practice“, Academic Press, New York.

Cuhna-Vaz J 1979: The blood-ocular barriers. *Surv Ophthalmol* 23: 279-296

Cunningham JJ 1998: The Glucose/Insulin System and Vitamin C: Implications in Insulin-Dependent Diabetes mellitus; *Journal of the American College of Nutrition* 17: 105-108

DCCT 2000: The Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes interventions and complications Research group Retinopathy and nephropathy in patients with type I diabetes for years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 342: 382-389

Dierks K, Dieckmann M, Niederstrasser D, Schwartz R, Wegener A 1998: Protein size resolution in human eye lenses by dynamic light scattering after in vivo measurements. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 236: 18-23

Dietl H, Arend O 1999: Die Bedeutung von Mikronährstoffen bei seniler Katarakt, altersabhängiger Makuladegeneration und diabetischer Retinopathie. Kap. III/2



diabetische Retinopathie 25-26, Kap iV/2a Vitamin C 31-39; Stockdorf: Forum Medizin Verl. Ges.

Englard S, Seifter S 1986: The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann J Clin Nutr* 34: 1356-1361

Esser P, Heimann K, Wiedemann P 1993: Macrophages in proliferative vitreoretinopathy and proliferative diabetic retinopathy: differentiation of subpopulations. *Br J Ophthalmol* 77: 731-3.

Falbe-Hansen I, Ehlers N, Degn JK 1969: The development of the human foetal vitreous body. I. Biochemical changes. *Acta Ophthalmol* ; 47: 39-43

Ferris F 1996: Early photocoagulation in patients with either type I or type II diabetes. *Trans Amer Ophthal Soc* 94: 505-537

Foos RY, Krieger AE, Fosythe AB, et al 1980: Posterior vitreous detachment in diabetic subjects. *Ophthalmology* 87: 122-128

Forth W Hrsg. 1992: *Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg

Fredj-Reygrobellet D, Baudouin C, Negre F, Caruelle JP, Gastaud P, Lapalus P 1991: Acidic FGF and other growth factors in preretinal membranes from patients with diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Res.* 23: 154-61.

Freeman MI, Jacobson B, Toth LZ, Balazs EA 1968: Lysosomal enzymes associated with vitreous hyalocyte granules. Intracellular distribution pattern of enzymes. *Exp Eye Res* 7: 113-120

Friedenwald JS, Bushke W, MichelHO 1944: Role of ascorbic acid (vitamin C) in secretion of intraocular fluid. *Arch Ophthalmol* 29: 535-574

Gandorfer A, Kampik A 2000: pars plana-Vitrektomie bei diabetischer Retinopathie – vom pathogenetischen Prinzip zur operativen Strategie. *Ophthalmologe* 325-330

Gandorfer A 2007: Pharmacologic Vitreolysis in Diabetic Retinopathy Lang GE (ed.). *Dev Ophthalmol*. Basel, Karger, 2007, vol 39: 149-156

Gaudric A, Haouchine B, Massin P, Paques M, Blain P, Erginay A 1999: Macular hole formation—New data provided by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 117: 744

Grisanti S, Guidry C 1995: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 391-405.

Grisanti S, Wiedemann P, Weller M, Heimann K, Zilles K 1991: The significance of complement in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2711-7

Hammes HP 2004: Diabetische Retinopathie: Ein internistischer Beitrag zu einem ophthalmologischen Thema. *Ophthalmologe* 101: 1159-1164

Hankinson SE, Stampfer MJ, Seddon JM, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Willet, WC 1992: Nutrient intake and cataract extraction in women: A prospective study. *Br Med J* 305: 335-339

Harris MI 1998: Diabetes in America: epidemiology and scope of the problem. *Diabetes Care* 21 (Suppl 3): C11-14

Herold G (Hrsg.), Deuss U *Arzt+Information Verlag Köln* 2001: Innere Medizin, Kap. IX, 575-585

Hiscott PS, Grierson I, Trombetta CJ, Rahi AH, Marshall J, McLeod D 1984: Retinal and epiretinal glia--an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 68: 698-707.

Hofmann H, Schmut O 1974: Versuche zur Verflüssigung des Glaskörpers. V Graefes Arch Klin Exp Ophthal 90: 347-351

Hofmann H, Schmut O 1977: Vergleich der Bromcyanbruchstücke von Glaskörperkollagen und Typ II Kollagen. V Graefes Arch Klin Exp Ophthal 204: 281-285

Hollwich F Hrsg 1988: Augenheilkunde: ein kurzgefaßtes Lehrbuch. Thieme Verlag 11. Auflage. Stuttgart, New York

Jacques PF, Taylor A, Hankinson SE, Willett WC, Mahnken B, Lee Y, Vaid K, Lahav M 1997: Long-term vitamin C supplement use and prevalence of early age-related lens opacities. Am J Clin Nutr 66: 911-916

Janka HU, Standl E, Standl R 1998: Allgemeiner Überblick über die Angiopathie. Diabetologie in Klinik und Praxis 334-365

Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M, Glaser BM 1989: Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. Ophthalmology 96: 801-10

Jongebloed WL, Worst JFG 1987: The cisternal anatomy of the vitreous body. Doc Ophthalmol 67: 183-196

Kasper H 1996: Ernährungsmedizin und Diätetik. 8. Auflage Urban + Schwarzenberg Verlag München

Kent MJC, Light ND, Bailey AJ 1985: Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. Biochem J 225: 745-752

Kinsey VE 1947: Transfer of ascorbic acid and related compounds across the blood aqueous barrier. Am J Ophthalmol 30: 1262-1266

Kloti R 1967: Experimental occlusion of retinal and ciliary vessels in owl monkeys. I. Technique and clinical observations of selective embolism of the central retinal artery system. *Exp Eye Res* 6: 393-9

Knox WE, Guswami M 1961: Ascorbic acid in tyrosine metabolism. *Adv Clin Chem.* 4: 121-216

Laqua H, Machemer R 1975: Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 602-18

Lemmen KD, Gerke E 1994: Stadieneinteilung und Lasertherapie der diabetischen Retinopathie und Makulopathie. R. Kaden; Heidelberg.

Limb GA, Little BC, Meager A, Ogilvie JA, Wolstencroft RA, Franks WA, Chignell AH, Dumonde DC 1991: Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 5: 686-93

Lindner B 1966: Acute posterior vitreous attachment and its retinal complications. *Arch Ophthalmol (Copenh) (Suppl)* 87: 1-108

Lohmann W 1987: Ascorbic acid and cataract. *Ann NY Acad Sci.* 498: 307-311

Looke G 2003: Die Untersuchung von nichtenzymatisch glykosiliertem Glaskörperkollagen in vitro durch dynamische Lichtstreuung. Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Bonn

Lundquist O, Österlin S 1994: Glucose concentration in the vitreous of nondiabetic and diabetic human eyes. *V Graefes Arch Klin Exp Ophthalm* 232: 71-74

Machemer R, Laqua H. 1975: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80: 1-23.

Mainster MA, Timberlake GT, Webb RH et al 1982: Scanning laser ophthalmoscopy—Clinical applications. *Ophthalmology* 89: 852

Malone JL, Morrison AD, Pavan PR, Cuthbertson DD 2001: Diabetic control and Complications Trial. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type I diabetes of less than 5 years duration screened for the diabetes control and complication trial. *Diabetes care* 24: 522-526

Marshall G, Garg SK, Jackson WE, Holmes DL, Chase HP 1993: Factors influencing the onset and progression of diabetic retinopathy in subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology* 100: 1133-9

Marshall GE, Konstas AG, Lee WR 1993: Collagens in ocular tissues. *Br J Ophthalmol* 77: 515-24

McGahan MC, Fleischer LN 1986: Antioxidant activity of aqueous and vitreous humor from the inflamed rabbit eye. *Curr Eye Res* 5: 641-645

McLaren D 1970: Nutritional aspects of the eye. In: Graymore, ed. *Biochemistry of the Eye*. New York: Academic press; 540

Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR 1986: Relation between complications of Type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med*; 314: 403-408.

Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Mityata S, Grandhee S, Odetti P, Ibrahim SA 1992: Maillard reaction mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging and uremia. *Diabetes* 41: 36-41

Newsome DA, Rodrigues MM, Machemer R. 1981: Human massive periretinal proliferation. In vitro characteristics of cellular components. *Arch Ophthalmol* 99: 873-80.

Nie S, Bergbauer KL, Kuck JF Jr, Yu NT 1990: Near infrared Fourier transform Raman spectroscopy in human lens research. *Exp Eye Res* 51: 619

Oksala A 1978: Ultrasonic findings in the vitreous body at various ages. *V Graef Arch Klin Exp Ophthalmol* 207: 275-280

Oliveira LB, Tatebayashi M, Mahmoud TH et al 2001: Dispase facilitates posterior vitreous detachment during vitrectomy in young pigs. *Retina* 21: 324-331

Pena RA, Jerdan JA, Glaser BM 1994: Effects of TGF-beta and TGF-beta neutralizing antibodies on fibroblast-induced collagen gel contraction: implications for proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2804-8

Perejda AJ, Uitto J 1982: Nonenzymatic glycosylation of collagen and other proteins – Relationship to development of diabetic complications. *Coll Relat Res* 2: 82-88

Pecora R 1985: „Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy“, Plenum Press

Pischel DK 1952: Detachment of the vitreous as seen with slit lamp examination. *Trans Am Ophthalmol Soc* 50: 329-346

Pournaras CJ 1995: Retinal oxygen distribution. Its role in the physiopathology of vasoproliferative microangiopathies. *Retina* 15: 332-47

Rathmann W, Haastert B, Icks A, Lowel H, Meisinger C, Holle R, Giani G 2003: High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany; target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologica* 46: 182-189

Ringvold A 1980: Aqueous humor and ultraviolet radiation. *Acta Ophthalmol* 58: 69-82

Ringvold A, Anderssen E, KjØnniksen I 2000: Distribution of Ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 20-23

Robbins SG, Brem RB, Wilson DJ, O'Rourke LM, Robertson JE, Westra I, Planck SR, Rosenbaum JT. 1994: Immunolocalization of integrins in proliferative retinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3475-85.

Rösen P 1999: Diabetes Forschungsinstitut der Universität Düsseldorf; Broschüre zum Vitaminsymposium vom 13.11.1999 in Frankfurt/M

Rose RC, Gogia R, Richer SP 1997: Properties of electrochemically active components in mammalian vitreous humor. *Exp Eye Res* 64: 807-812

Rose RC, Richer SP, Bode AM. 1998: Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 397-407

Rosenbloom AL, Silverstein JM, Lezetto DC et al 1981: Limited joint mobility in childhood diabetes mellitus indicates increased risk for microvascular disease. *N Engl J Med* 305: 191-194

Rovati L, Frankhauser II F, Ricka J 1995: Dynamic light scattering spectroscopy of in vivo human vitreous. *Proc. Lasers in Ophthalmology III, Progress in Biomedical Optics, Europto series, SPIE, R.Birngruber and A.F.Fercher Eds. 2632, 73-78, Barcelona, Spain.*

Rovati L, Frankhauser II F, Docchio F, Van Best J 1998: Diabetic retinopathy assessed by dynamic light scattering and corneal autofluorescence. *Journal of Biomedical Optics* 3: 357-363

Sachsenweger M 1994, Hrsg.; *Augenheilkunde*, Kap.12: 283-290, Thieme Verlag, Stuttgart

Sakuma T, Tanaka M, Mizota A, Inoue J, Pakola S 2005: Safety of in vivo Pharmacologic vitreolysis with recombinant microplasmin in rabbit eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 46: 3295-3299

Schmut O, Hofmann H 1974: Viscositätsmessungen von Rinderglaskörperhomogenat zur Untersuchung der Molekülveränderung. V Graefes Arch Klin Exp Ophthal 191: 307-314

Schmut O, Hofmann H 1976: Die Veränderung der Hyaluronsäure des Glaskörpers durch Oxidations-Reduktions-Systeme. V Graefes Arch Klin Exp Ophthal 201: 169-174

Schulze T 1996: Ein Echtzeitsystem zur Messung der dynamischen Lichtstreuung in Flüssigkeiten, Experimentelle Diplomarbeit am Fachbereich Physik der Universität Hamburg

Sebag J 1989: The Vitreous: structure, function and pathobiology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 73-96

Sebag J, Balazs EA 1984: Human vitreous structure in childhood. Proceedings of the Sixth congress of the International Society for Eye Research, Alicante Spain

Sebag J, Buzney SM, Belyea DA, Kado M, McMeel JW, Trempe CL 1990: Posterior Vitreous detachment following panretinal laser photocoagulation. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol 228: 5-8

Sebag J 1992: Effects of diabetes on vitreous collagen and role of vitreous in proliferative diabetic retinopathy. Club Jules Gronin XVIII Meeting in Vienna

Sebag J, Reiser K, Buckingham B, Charles MA 1992: Biochemical abnormalities in vitreous of humans with proliferative diabetic retinopathy. Arch Ophthalmol 110: 1472-1479



Sebag J, Nie S, Reiser K, Buckingham B, Charles MA, Yu NT 1994:  
Ramanspectroscopy of human vitreous in proliferative diabetic retinopathy. Invest  
Ophthalmol Vis Sci 35: 2976-2980

Sebag J 1997: Guest editorial: Classifying posterior vitreous detachment—a new way to  
look at the invisible. Br J Ophthalmol 81: 521

Sebag J, Ansari RR, Dunker S, Suh K 1999: Dynamic light scattering (DLS)  
measurements in diabetic human vitreous. Invest Ophthalmol Vis Sci 38: 426

Sebag J, Ansari RR, Dunker S, Suh K 1999: Dynamic light scattering of diabetic  
vitreopathy. Diabetes Technology & Therapeutics 169-176

Sinclair AJ, Girling AJ, Gray L, Guen Cle, Lunec J, Barnett AH 1991: Disturbed handling  
of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose  
ascorbate supplementation; Diabetologica 34: 171-175

Starke AAR 1995: „Pathobiochemie, Pathophysiologie und Pathogenese der  
diabetischen Mikroangiopathie“ Kap.22 (264-274) aus Diabetes Mellitus (Hrsg. Berger),  
Urban&Fischer Verlag, München, Jena

Stitt AW 2003: The Role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic  
retinopathy. Exp Mol Pathol 75: 95-108

Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DAC, Bucala R, Vlassara H,  
Archer DB 1998: Advanced glycation end products in vitreous: structural and functional  
implications for diabetic vitreopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 39: 2517-2523

Tanaka T, Benedek GB 1975: Observation of protein diffusivity in intact human and  
bovine lenses with application to cataract. Invest Ophthalmol Vis Sci 14: 449-456

Takano S, Ishiwata S, Nakazawa M, Mizugaki M, Tamai M 1997: Determination of ascorbic acid in human vitreous humor by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Curr Eye Res* 16: 589-594

Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Rody MA, Ganz P, Creager MA 1998: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation with insulin-dependent Diabetes mellitus; *Journal of the American College of Cardiology* 31: 552-7

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Ganz P, Creager MA 1996: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation with non-insulin-dependent Diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 97: 22-8

Toti P, Greco G, Catella AM. 1994: Morphological and pathogenetic aspects of proliferative vitreo-retinopathy. A histological and immunohistochemical study. *Doc Ophthalmol* 88: 105-12

UKPDS - U.K.Prospective Diabetes Study Group 1998: Intensive Blood-Glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. UKPDS 33. *Lancet* 352: 837-853

UKPDS Group 1998: Tight Blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 317: 703-713

Van Horn DL, Aaberg TM, Macheimer R, Fenzl R. 1977: Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 84: 383-93

Varma SD 1987: Ascorbic acid and the eye with special reference to the lens. *Ann NY Acad Sci* 498: 280-306

Vitale S, West S, Hallfrisch J, Alston C, Wang F, Moorman C, Muller D, Singh V, Taylor HR. 1993: Plasma antioxidants and risk of cortical and nuclear cataract. *Epidemiology* 4: 195-203

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A 1986: Novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger receptors. *J Exp Med* 164: 1301-1309

Wagner M, Benson MT, Rennie IG, MacNeil S. 1995: Effects of pharmacological modulation of intracellular signalling systems on retinal pigment epithelial cell attachment to extracellular matrix proteins. *Curr Eye Res* 14: 373-84

Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K 1992: Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol* 76: 550-2

Wiedemann P, Weller M 1988: The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol* 189: 1-15

Wiedemann P, Weller M, Heimann K. 1990: Proliferative vitreoretinopathy: new discoveries in pathophysiology and therapy, *Klin Monatsbl Augenheilkd* 197: 355-61

Will JC, Byers T 1996: Does Diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C ? *Nutrition Reviews* 54: 193-202

Xiong H, Cheng HM 1979: Changes of vitreous tonicity in "sugar" cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 413-414

Zeng Y, Yang J, Huang K, Lee Z, Lee X 2001: A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea. *Journal of Biomechanics* 34: 533-537

Zhang XM, Ohishi K, Hiramitsu T 2001: Microdialysis Measurement of Ascorbic Acid in rabbit vitreous after photodynamic reaction. *Exp Eye Res* 73: 303-309

Zietschmann O Hrsg., Ellenberger W, Baum H 1943: *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*. 18. Auflage, 1066 Springer Verlag Berlin

Zimmet P, Albert KG, Shaw J 2001: Global and societal implications of the diabetic epidemic. *Nature* 414: 782-787

## **8 Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arterie
Abb	Abbildung
AGE	advanced glycation endproduct
AKF/ACF	Autokorrelationsfunktion
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
C	Kohlenstoff
ca.	circa
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DR	diabetische Retinopathie
EDRF	endothelium derived relaxing factor
engl.	englisch
GK	Glaskörper
H	Wasserstoff
HA	Hyaluronsäure –hyaluronic acid
HDL	high density lipoprotein
KW	Kammerwasser
Lj	Lebensjahr
MA	Mikroaneurysma
NH	Netzhaut
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	Stickstoff, -oxid
OCT	optische Cohärenztomographie
PBS	Phosphatpufferlösung
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
PDVR	proliferative diabetische Vitreoretinopathie
PKS	Photokorrelationsspektroskopie
PVR	proliferative Vitreopathie
ret.	retinal
RPE	retinales Pigmentepithel
SLO	Scanning Laserophthalmoskop, -ie
V.	Vene
w/o	engl. without; ohne
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

**9 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Verflüssigung des Glaskörpers	Seite 14
Abb. 2	Diabetes mellitus	18
Abb. 3	Pentosidinmolekül	21
Abb. 4	Ausbildung von AGE-Crosslinks	23
Abb. 5	Pathogenese der diabetischen Angiopathie	24
Abb. 6	Glaskörperkollagen bei Gesunden und Diabetikern	29
Abb. 7	Ascorbinsäure	33
Abb. 8	Vitaminkonzentrationen in verschiedenen Augenabschnitten	35
Abb. 9	Die Autokorrelationsfunktion einer fluktuierenden Grösse $x(t)$	42
Abb. 10	Einzelne Komponenten des DLS-Platzes	44
Abb. 11	Messapparatur zur Durchführung von DLS	44
Abb. 12	Darstellung einer einzelnen DLS Messung	46
Abb. 13	Radiushistogramm einer DLS Messung	47
Abb. 14	Wertevergleichsdarstellung von DLS Messungen	47

**10 Anhang**

Schema der Probenansätze und Inkubationszeiten:

Probe	Kollagen in mg	Glucose in mg/ml	Vitamin C in mg/ml	Na-Acid in %	PBS in ml	Inkubationszeit der 2 versch. Proben	Anzahl der einzeln Pr.
<b>1+37</b>	5	0	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>2+38</b>	10	0	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>3+39</b>	20	0	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>4+40</b>	5	0	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>5+41</b>	10	0	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>6+42</b>	20	0	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>7+43</b>	5	0	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>8+44</b>	10	0	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>9+45</b>	20	0	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>10+46</b>	5	0	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>11+47</b>	10	0	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>12+48</b>	20	0	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>13+49</b>	5	36,03	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>14+50</b>	10	36,03	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>15+51</b>	20	36,03	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>16+52</b>	5	36,03	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>17+53</b>	10	36,03	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>18+54</b>	20	36,03	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>19+55</b>	5	36,03	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>20+56</b>	10	36,03	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>21+57</b>	20	36,03	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>22+58</b>	5	36,03	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>23+59</b>	10	36,03	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>24+60</b>	20	36,03	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>25+61</b>	5	540,48	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>26+62</b>	10	540,48	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>27+63</b>	20	540,48	0	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>28+64</b>	5	540,48	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>29+65</b>	10	540,48	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>30+66</b>	20	540,48	0,5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>31+67</b>	5	540,48	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2

<b>32+68</b>	10	540,48	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>33+69</b>	20	540,48	5	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>34+70</b>	5	540,48	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2
<b>35+71</b>	10	540,48	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	3 x2
<b>36+72</b>	20	540,48	10	0,02	2	2 Mon + 3 Mon	2 x2



## Tabellarische Versuchsergebnisse:

Probe Nr.:	Koll in mg	Gluc in M	Vit C in µg/ml	Zeit in M.	05.06.2002 in nm	09.08.2002 in nm	09.09.2002 in nm
1a	5	0	0	2	202,36±27,72	193,02±24,66	173,57±40,74
1b	5	0	0	2	347,98±82,4	90,68±5,4	345,52±50,58
2a	10	0	0	2	163,78±26,3	325,59±78,52	323,33±68,26
2b	10	0	0	2	202,85±35,83	115,29±28,91	176,39±21,85
2c	10	0	0	2	168,28±36,26	359,68±90,29	249,18±56,32
3a	20	0	0	2	191,01±28,2	194,33±42,58	246,15±69,65
3b	20	0	0	2		245,82±56,17	326,21±61,61
4a	5	0	500	2	254,8±68,01	1230,76±162,26	
4b	5	0	500	2	245,04±50,79	nicht messbar	
5a	10	0	500	2	143,82±31,37	349,28±69,76	
5b	10	0	500	2	130,76±23,87	1,66±0,36	
5c	10	0	500	2	134,14±25,78	nicht messbar	
6a	20	0	500	2	223,03±32,43	1,53±0,25	
6b	20	0	500	2		1,61±0,29	
7a	5	0	5000	2	425,06	nicht messbar	
7b	5	0	5000	2	232,21±63,44	36,58±6,24	
8a	10	0	5000	2	106,71±18,39	64,14±13,23	
8b	10	0	5000	2	206,38±55,03	nicht messbar	
8c	10	0	5000	2	76,12±22,02	108,42±29,52	
9a	20	0	5000	2	377,67±54,78	1,49±0,12	
9b	20	0	5000	2	103,51±22,24		
10a	5	0	10.000	2	160,71±34,56	1,41±0,16	
10b	5	0	10.000	2	160,74±28,51	nicht messbar	
11a	10	0	10.000	2	180,86±51,56	189,33±33,96	
11b	10	0	10.000	2	186,88±35,44	nicht messbar	
11c	10	0	10.000	2	150,86±32,67	nicht messbar	
12a	20	0	10.000	2	180,08±30,07	nicht messbar	
12b	20	0	10.000	2		nicht messbar	
13a	5	0,2	0	2	211,04±24,03	101,74±20,58	192,09±39,21
13b	5	0,2	0	2	161,81±24,17	122,24±32,24	156,03±33,71
14a	10	0,2	0	2	89,93±24,32	441,6±110±74	258,92±37,06
14b	10	0,2	0	2	108,19±14,76	398,35±53,94	190,24±36,55
14c	10	0,2	0	2	210,62±48,48	330,1±65,05	259,51±63,85
15a	20	0,2	0	2	188,54±52,85	342,33±71,83	413,03±106,69
15b	20	0,2	0	2		811,43±119,04	341,94±41,76
16a	5	0,2	500	2	234,70±45,98	1,52±0,29	
16b	5	0,2	500	2	193,83±20,43	nicht messbar	
17a	10	0,2	500	2	109,00±31,86	144,28±11,69	
17b	10	0,2	500	2	174,15±34,3	nicht messbar	

17c	10	0,2	500	2	147,49+/-39,23	nicht messbar	
18a	20	0,2	500	2	148,89+/-29,94	1,6+/-0,24	
18b	20	0,2	500	2		1,75+/-0,1	
19a	5	0,2	5000	2	215,22	nicht messbar	
19b	5	0,2	5000	2	237,34+/-57,15	nicht messbar	
20a	10	0,2	5000	2	159,76+/-35,9	1,62+/-0,21	
20b	10	0,2	5000	2	176,98+/-48,01	1,59+/-0,36	
20c	10	0,2	5000	2	189,73+/-48,44	218,32+/-40,14	
21a	20	0,2	5000	2	235,66+/-54,76	2,78+/-0,2	
21b	20	0,2	5000	2		29,23+/-2,84	
22a	5	0,2	10.000	2	232,83+/-51,39	nicht messbar	
22b	5	0,2	10.000	2	170,16+/-46,99	nicht messbar	
23a	10	0,2	10.000	2	173,77+/-39,15	nicht messbar	
23b	10	0,2	10.000	2	147,21,5	nicht messbar	
23c	10	0,2	10.000	2	206,19+/-46,93	nicht messbar	
24a	20	0,2	10.000	2	165,8+/-47,21	nicht messbar	
24b	20	0,2	10.000	2		nicht messbar	
25a	5	3	0	2	505,71+/-60,71	994,83+/-229,07	1115,12+/-180,50
25b	5	3	0	2	549,66+/-127,13	621,66+/-127,87	992,59+/-106,78
26a	10	3	0	2	381,55+/-99,93	496,48+/-83,58	723,44+/-175,35
26b	10	3	0	2	418,15+/-80,04	391,15+/-98,13	826,14+/-110,95
26c	10	3	0	2	415,69+/-70,42	555,09+/-41,69	561,58+/-109,97
27a	20	3	0	2	303,41+/-67,41	376,01+/-79,55	402,60+/-57,16
27b	20	3	0	2		386,17+/-68,12	736,78+/-99,59
28a	5	3	500	2	664,3+/-186,36	482,53+/-106,37	
28b	5	3	500	2	541,02+/-137,43	287,48+/-66,83	
29a	10	3	500	2	639,99+/-59,34	421,59+/-45,59	
29b	10	3	500	2	349,00+/-81,31	563,85+/-112,06	
29c	10	3	500	2	324,13+/-77,43	nicht messbar	
30a	20	3	500	2	394,23+/-64,65	164,76+/-21,77	
30b	20	3	500	2		260,03+/-39,04	
31a	5	3	5000	2	414,11+/-86,61	1.27+/-0,0	
31b	5	3	5000	2	583,86+/-101,11	nicht messbar	
32a	10	3	5000	2	442,6+/-109,34	931,87+/-16,52	
32b	10	3	5000	2	397,6+/-83,66	nicht messbar	
32c	10	3	5000	2	451,39+/-82,39	nicht messbar	
33a	20	3	5000	2	443,74+/-80,11	103,79+/-16,52	
33b	20	3	5000	2		251,63+/-46,48	
34a	5	3	10.000	2	495,43+/-133,73	nicht messbar	
34b	5	3	10.000	2	376,25+/-82,72	nicht messbar	
35a	10	3	10.000	2	441,0+/-113,11	nicht messbar	
35b	10	3	10.000	2	346,31+/-91,91	nicht messbar	

35c	10	3	10.000	2	421,12+/-108,14	1.57+/-0,24
36a	20	3	10.000	2	357,19+/-65,06	nicht messbar
36b	20	3	10.000	2		nicht messbar
<hr/>						
37a	5	0	0	3	189,33+/-45,04	231,29+/-35,66
37b	5	0	0	3	187,83+/-40,41	274,19+/-29,47
38a	10	0	0	3	158,78+/-37,88	308,11+/-84,86
38b	10	0	0	3	185,78+/-40,98	312,21+/-78,89
38c	10	0	0	3	153,66+/-40,89	358,47+/-60,01
39a	20	0	0	3	105,29+/-14,95	190,74+/-22,06
39b	20	0	0	3	131,15+/-23,44	215,86+/-43,95
<hr/>						
40a	5	0	500	3	127,45+/-19,23	nicht messbar
40b	5	0	500	3	164,3+/-24,18	nicht messbar
41a	10	0	500	3	158,43+/-36,88	1648,89+/-345,46
41b	10	0	500	3	195,06+/-50,09	nicht messbar
41c	10	0	500	3	148,58+/-25,24	nicht messbar
42a	20	0	500	3	163,99+/-10,93	615,60+/-67,88
42b	20	0	500	3		830,12+/-110,85
<hr/>						
43a	5	0	5000	3	221,61+/-58,22	
43b	5	0	5000	3	275,25+/-23,4	nicht messbar
44a	10	0	5000	3	416,23+/-79,32	nicht messbar
44b	10	0	5000	3	143,04+/-37,49	
44c	10	0	5000	3	454,45+/-121,51	
45a	20	0	5000	3	409,01+/-40,42	514,53+/-78,04
45b	20	0	5000	3	828,28+/-95,84	
<hr/>						
46a	5	0	10.000	3	151,71+/-27,41	nicht messbar
46b	5	0	10.000	3	133,08+/-21,95	
47a	10	0	10.000	3	97,1+/-17,95	nicht messbar
47b	10	0	10.000	3	138,68+/-25,86	
47c	10	0	10.000	3	120,48+/-17,98	
48a	20	0	10.000	3	187,18+/-34,07	nicht messbar
48b	20	0	10.000	3	94,10+/-17,02	
<hr/>						
49a	5	0,2	0	3	206,06+/-49,28	256,18+/-37,96
49b	5	0,2	0	3	215,32+/-65,17	281,21+/-44,26
50a	10	0,2	0	3	197,29+/-41,86	308,72+/-85,67
50b	10	0,2	0	3	254,59+/-59,31	298,86+/-69,52
50c	10	0,2	0	3	189,77+/-42,95	181,03+/-46,10
51a	20	0,2	0	3	139,13+/-35,89	398,59+/-109,06
51b	20	0,2	0	3		393,42+/-72,35
<hr/>						
52a	5	0,2	500	3	167,52+/-37,43	
52b	5	0,2	500	3	193,,3+/-31,65	nicht messbar
53a	10	0,2	500	3	191,71+/-59,17	1365,24+/-191,82
53b	10	0,2	500	3	177,67+/-38,35	

53c	10	0,2	500	3	173,75+/-15,21	
54a	20	0,2	500	3	171,48+/-35,64	nicht messbar
54b	20	0,2	500	3		
55a	5	0,2	5000	3	180,66+/-49,92	nicht messbar
55b	5	0,2	5000	3	176,36+/-32,93	
56a	10	0,2	5000	3	143,49+/-26,77	651,14+/-117,29
56b	10	0,2	5000	3	121,83+/-22,11	
56c	10	0,2	5000	3	140,54+/-29,78	
57a	20	0,2	5000	3	153,89+/-40,19	461,04+/-86,73
57b	20	0,2	5000	3		
58a	5	0,2	10.000	3	161,95+/-45,23	253,68+/-36,19
58b	5	0,2	10.000	3	131,25+/-16,92	
59a	10	0,2	10.000	3	151,21+/-36,58	nicht messbar
59b	10	0,2	10.000	3	148,8+/-15,92	
59c	10	0,2	10.000	3	144,97+/-40,16	
60a	20	0,2	10.000	3	176,28+/-34,3	586,2+/-116,83
60b	20	0,2	10.000	3		
61a	5	3	0	3	659,17+/-96,82	854,72+/-144,45
61b	5	3	0	3	717,18+/-148,41	867,14+/-187,76
62a	10	3	0	3	293,65+/-74,06	878,72+/-123,64
62b	10	3	0	3	438,97+/-98,14	848,47+/-153,13
62c	10	3	0	3	581,72+/-122,2	835,88+/-66,163
63a	20	3	0	3	309,51	615,28+/-99,48
63b	20	3	0	3	309,23+/-65,76	444,45+/-78,55
64a	5	3	500	3	619,04+/-97,79	
64b	5	3	500	3	778,59+/-124,09	908,77+/-131,72
65a	10	3	500	3	382,02+/-81,72	698,25+/-162,44
65b	10	3	500	3	594,24+/-131,25	
65c	10	3	500	3	375,02+/-66,01	
66a	20	3	500	3	298,63+/-59,12	351,02+/-82,35
66b	20	3	500	3		
67a	5	3	5000	3	728,33+/-125,57	nicht messbar
67b	5	3	5000	3	575,71+/-95,83	
68a	10	3	5000	3	676,27+/-168,17	nicht messbar
68b	10	3	5000	3	264,04+/-61,2	
68c	10	3	5000	3	252,34	
69a	20	3	5000	3	349,36+/-55,0	nicht messbar
69b	20	3	5000	3		
70a	5	3	10.000	3	601,87+/-168,61	
70b	5	3	10.000	3	890,26+/-213,94	nicht messbar
71a	10	3	10.000	3	431,5+/-68,21	2540,00+/-377,94
71b	10	3	10.000	3	437,31+/-68,46	

71c	10	3	10.000	3	495,01+/-111,67	
72a	20	3	10.000	3	459,6	
72b	20	3	10.000	3	466,32+/-98,76	nicht messbar

## **11 Danksagung**

Für die Überlassung des Themas und für eine freundliche und geduldige Betreuung bei der Durchführung und der Versuchsabwicklungen der Messreihen, sowie eine nicht nur fachliche und moralische, sondern auch aufmunternde Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danke ich recht herzlich Herrn PD Dr. A. R. Wegener und Dr. S. Dunker.

Für die Bereitstellung der DLS-Messtechnik in seinem Hamburger Labor und die Gespräche, bei denen ich über die physikalischen Grundproblematiken der DLS-Instrumentarien viel lernen konnte, danke ich besonders Herrn Dr. Dierks.

Ferner möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie für die Hilfsbereitschaft und ihr Engagement danken. Insbesondere den Herren H. Landwehr und M. Ahrend gilt besondere Dank für die Stunden während der Präparationszeiten und die Aufbauarbeit bei den Experimenten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die nicht nur während meines Studiums sondern auch heute noch stets hinter mir stehen.

Besonders möchte ich hier auch meine Frau Diana nennen, nicht nur für ihre alltägliche Liebe, sondern insbesondere auch für ihre Unterstützung, ihre ständige Aufmunterung und für ihre liebevolle Hilfe während der zahlreichen Stunden im Labor und in unserer Freizeit gilt ich Ihr ein grosses Dankeschön.

---

**Vorabveröffentlichung der Ergebnisse:**

Poster auf dem ARVO Kongress 7. Mai 2003

Program\*/Poster\*: 3915/B618