

**Der Effekt von systemisch injiziertem Insulin
auf die Emmetropisierung im Tiermodell des
Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*)**

Masterarbeit

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt von

Berghus, Christina

Tübingen, März 2014

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass ich diese Arbeit selbst verfasst habe.
- dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt und dass ich alle wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommenen Aussagen als solche gekennzeichnet habe.
- dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

Tübingen, den 18.03.2014

Zusammenfassung

Insulin hat, wenn intravitreal injiziert, einen fördernden Effekt auf die Entstehung von Kurzsichtigkeit (Myopie) indem es das Wachstum der Vorderkammertiefe und der Linsendicke verstärkt. Zudem postuliert Cordain (2002), einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Insulinkonzentration im Blut und einer daraus resultierenden Myopie. In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob systemisch injiziertes Insulin dieselben Effekte wie intravitreal injiziertes Insulin auf die Emmetropisierung von Küken hatte. Sollte die systemische Gabe von Insulin die Entwicklung von Myopie fördern, könnten Empfehlungen für eine Umstellung der Ernährung beim Menschen entwickelt werden.

Insulin wurde im Laufe der Versuchswoche mehrmals systemisch (intravenös oder intraperitoneal) injiziert und die Refraktion, sowie die Längen der Kompartimente des Auges zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende gemessen. Da der Effekt von intravitreal injiziertem Insulin in Kombination mit einer Linsenbehandlung verstärkt wird, wurden einige Küken über die gesamte Dauer des Versuchs monokular mit einer Linse (± 7 D) behandelt. Weiter sollte analysiert werden, ob Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren konnte. Zwei Methoden wurden hierfür eingesetzt. Die Insulinkonzentration in Netzhaut und Aderhaut wurde zehn Minuten nach Insulininjektion mit Hilfe eines Insulin-ELISAs bestimmt. Darüber hinaus wurde die Aktivität der Signalwege, die durch die Bindung von Insulin an den Insulin- oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-(IGF)-1-Rezeptor der Netzhaut aktiviert werden, zwei Stunden nach Injektion mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Weiter sollte festgestellt werden, ob Insulin einen Effekt auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers sowie des Blutes zehn Minuten bzw. zwei Stunden nach Injektion hatte.

Die Erhöhung der systemischen Insulinmenge hatte nicht die Entwicklung von Kurzsichtigkeit zur Folge. Stattdessen wurde das Wachstum der Vorderkammertiefe unterbunden und die Entstehung von Weitsichtigkeit (Hyperopie) in Augen mit normaler Seherfahrung gefördert. Da das Übertreten von systemischem Insulin ins Auge weder durch die Ergebnisse des Insulin-ELISAs noch durch die des Western Blots bestätigt werden konnte wäre es denkbar, dass durch die erhöhte systemische Insulinkonzentration Sekundärprozesse beeinflusst wurden, die nachfolgend die Entstehung von Hyperopie bewirkten. Möglich wäre, dass die starke Abnahme der Glukosekonzentration zwei Stunden nach Insulininjektion im Glaskörper und Blut einen Einfluss hatte.

Da Insulin jedoch nicht nur im Glukosemetabolismus beteiligt ist, sondern in vielen zellulären Prozessen eine Rolle spielt, ist eine Auswirkung auf weitere Sekundäre Prozesse möglich, die Einfluss auf die Emmetropisierung gehabt haben könnten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Auge	1
1.1.1	Strahlengang im Auge.....	1
1.1.2	Aufbau der Netzhaut	2
1.1.3	Die Blut-Augen-Schranke.....	3
1.1.4	Emmetropisierung: die postnatale Refraktionsentwicklung.....	6
1.1.5	Fehlsichtigkeit (Ametropie).....	6
1.2	Wodurch wird das Augenwachstum reguliert?	9
1.2.1	Umweltfaktoren die mit der Refraktionsentwicklung assoziiert werden	9
1.2.2	Hinweise durch Linsenexperimente	12
1.2.3	Welche Moleküle steuern das Augenlängenwachstum?.....	15
1.3	Wissenschaftliche Fragestellung	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Der Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Emmetropisierung des unbehandelten Auges und auf die Emmetropisierung mit hyperopem oder myopem Defokus	21
2.1.1	Tiere & Tierhaltung.....	21
2.1.2	Versuchsablauf	21
2.1.3	Linsen & Injektionen.....	22
2.1.4	Refraktionsmessung	23
2.1.5	Messung der Längen der Kompartimente des Auges.....	25
2.1.6	Präparation der Augen	26
2.1.7	Messung der Glukosekonzentration.....	27
2.1.8	Gewebepräparation.....	27
2.2	Bestimmung der Insulinkonzentrationen in Netzhaut, Aderhaut und Glaskörper (Insulin-ELISA).....	28
2.3	Bestimmung der Aktivität des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs in der Netzhaut (SDS-Page & Western Blot)	30

3	Ergebnisse	38
3.1	Der Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Emmetropisierung des unbehandelten Auges und auf die Emmetropisierung mit hyperopem oder myopem Defokus	38
3.1.1	Der Effekt von Insulin auf die Refraktionsentwicklung	39
3.1.2	Der Effekt von Insulin auf die Achsenlänge	43
3.1.3	Der Effekt von Insulin auf die Vorderkammertiefe.....	47
3.1.4	Der Effekt von Insulin auf die Linsendicke	51
3.1.5	Der Effekt von Insulin auf die Glaskörpertiefe	54
3.2	Analyse der Insulinkonzentration in Aderhaut und Netzhaut (Insulin-ELISA)	59
3.3	Die Aktivierung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs in der Netzhaut nach systemischer Insulininjektion (Western-Blot)	60
3.3.1	mit myopem Defokus	61
3.3.2	mit hyperopem Defokus	62
3.4	Der systemische Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration im Glaskörper und Blut	64
3.4.1	mit normaler Seherfahrung	64
3.4.2	mit Defokus	65
4	Diskussion	67
4.1	Der Effekt von Insulin auf die Entwicklung des Auges mit normaler Seherfahrung und auf die Entwicklung mit hyperopem oder myopem Defokus	68
4.2	Kann Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren?	74
4.3	Der Einfluss von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers und des Blutes.....	77
4.4	Schlussfolgerung	80
	Literaturverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	VII
	Tabellenverzeichnis	IX

1 Einleitung

1.1 Das Auge

1.1.1 Strahlengang im Auge

Wir sehen ein Objekt, weil es Licht reflektiert und dieses Licht in unser Auge eintritt. Das eintretende Licht wird an der Hornhaut (Kornea, Abb. 1) gebrochen, auf welche drei Viertel der Gesamtbrechkraft des Auges entfällt, und passiert die mit Kammerwasser gefüllte vordere Augenkammer (Vorderkammer). Die Iris, die zwischen der vorderen und der hinteren Augenkammer liegt bestimmt durch den Durchmesser ihrer mittig positionierten, runden Öffnung (Pupille) die Lichtmenge, die weiter in das Auge vordringen kann, und somit auch die Tiefenschärfe des von uns wahrgenommenen Bildes. Das Licht, dass durch die Iris in das Auge eintritt und die vordere Augenkammer passiert, wird durch die Linse, welche bis zu einem Viertel zur Gesamtbrechkraft des Auges beiträgt, erneut gebrochen.

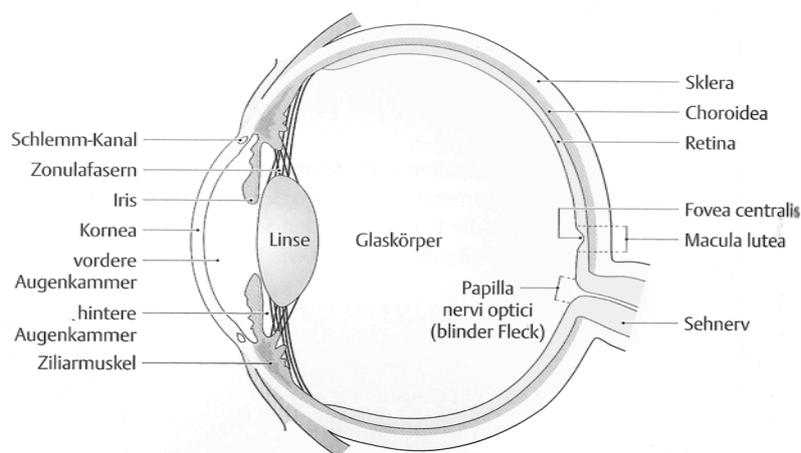


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Auges (Quelle: Taschenlehrbuch Physiologie, Michael Gekle, Thieme Verlag)

Die lichtbrechenden Strukturen des Auges werden gemeinsam als dioptrischer Apparat bezeichnet. Die Brechkraft der Linse wird durch den Vorgang der Akkomodation variiert. Bei Fernakkomodation, ein Zustand in dem die Linse die geringste Brechkraft aufweist, werden Objekte in der Ferne scharf auf der Netzhaut abgebildet. Ein Objekt wird scharf gesehen, wenn jeder Punkt dieses Objektes auf genau einen Punkt der Netzhaut (Retina) fokussiert wird. Sollen Objekte in der Nähe fokussiert werden muss die Brechkraft der Linse erhöht werden (Nahakkomodation). Welches Objekt wir fokussieren geschieht willentlich. Da das fokussierte Objekt scharf auf der Netzhaut abgebildet wird bedeutet es jedoch auch, dass

Objekte, die sich hinter oder vor dem fokussierten Objekt befinden, unscharf auf der Netzhaut abgebildet und damit verschwommen wahrgenommen werden (Wallman, 1993). Die Brechkraft eines optischen Systems ist als Quotient von Brechzahl zu Brennweite definiert und wird in Dioptrien ($D = m^{-1}$) angegeben. Das Verhältnis zwischen der Achsenlänge des Auges und der Brechkraft des dioptrischen Apparats wird als Refraktion bezeichnet. Ein emmetropes Auge hat keinen Refraktionsfehler (Refraktion = 0), bei Fernakkommodation entsteht das scharfe Bild auf der Netzhaut. Ein Refraktionsfehler liegt vor, wenn das scharfe Bild nicht auf Höhe der Netzhaut entsteht (vor der Netzhaut: $R < 0$; hinter der Netzhaut $R > 0$). Tritt das Licht aus der Linse aus passiert es den gelartigen, durchsichtigen Glaskörper und trifft auf die Netzhaut. Auf Höhe der Photorezeptoren entsteht durch die beschriebenen Eigenschaften des Auges ein verkleinertes, reelles und scharfes Bild des Objektes. In der Netzhaut wird die physikalische Energie des Lichtes von den Photorezeptoren in neuronale Signale umgewandelt, die an die visuellen Areale des Gehirns weitergeleitet werden. Hinter der Netzhaut befindet sich das retinale Pigmentepithel (RPE) welches einfallendes Licht absorbiert und abgestoßene Photorezeptoren der Netzhaut abbaut. Zudem ist es Teil der Blut-Augen-Schranke (siehe Kapitel 1.1.3 Blut-Augen-Schranke). Hinter dem RPE liegt die Aderhaut (Choroidea), welche stark von Blutgefäßen durchzogen ist und der Versorgung der äußeren Netzhaut dient. Die äußerste Wand des Augenbulbus liegt der Aderhaut auf, wird als Lederhaut (Sklera) bezeichnet und ist maßgeblich für die Form und den Schutz des Auges verantwortlich.

1.1.2 Aufbau der Netzhaut

Damit die Netzhaut Licht in neuronale Signale umwandeln und bereits eine umfangreiche Vorverarbeitung durchführen kann bevor sie die Information an das Gehirn weiterleitet besitzt sie eine Vielzahl von Zelltypen. Am RPE liegt die Schicht der Photorezeptoren, bestehend aus Stäbchen und Zapfen, an (Abb. 2). Da die Photorezeptoren auf der lichtabgewandten Seite liegen und das Licht erst die ganze Dicke der Netzhaut durchdringen muss, um auf die lichtempfindlichen Teile der Photorezeptoren zu fallen, wird das menschliche Auge zu den „invertierten“ Augen gezählt. Zapfen dienen dem Farbsehen (photopisches Sehen) während Stäbchen dem Nachtsehen (skotopischen Sehen) dienen. Mit ihrem basalen Ende kontaktieren die Sehzellen die Dendriten von Bipolar- und Horizontalzellen. Die Horizontalzellen dienen der lateralen Verschaltung der Photorezeptoren. Die Bipolarzellen leiten die von den Photorezeptoren ankommende Information an die Ganglienzellen weiter, welche die innerste Schicht der Netzhaut bilden. Das von den Bipolarzellen an die Ganglienzellen weitergegebene Signal wird durch die Amakrinzellen moduliert. Die Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv und treten gebündelt am blinden Fleck aus dem Auge

aus. Ein weiterer Zelltyp der Netzhaut sind die so genannten Müllerzellen, die Gliazellen der Netzhaut, die den zweithäufigsten Zelltyp der Netzhaut darstellen.

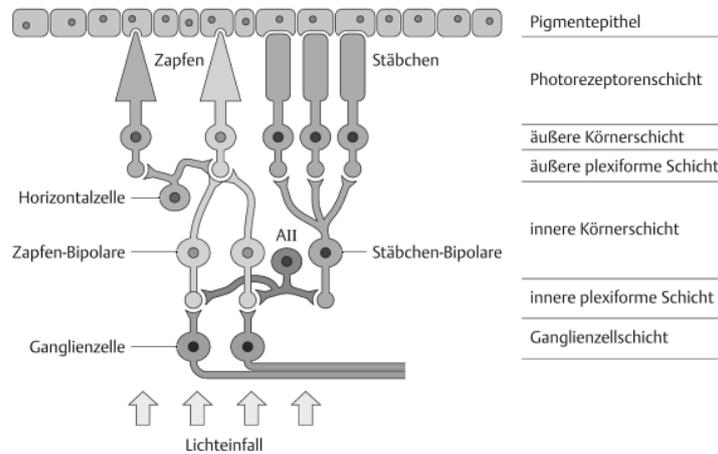


Abbildung 2: Zellulärer Aufbau der Netzhaut. (Quelle: Taschenlehrbuch Physiologie, Michael Gekle, Thieme Verlag)

1.1.3 Die Blut-Augen-Schranke

Das Auge ist durch eine physiologische Barriere, der Blut-Augen-Schranke (engl. *blood ocular barrier*), vom Blutkreislaufsystem abgegrenzt. Durch diese Barriere wird der unkontrollierte Austausch von Ionen, Proteinen und Wasser zwischen Blut und Auge unterbunden und die Homöostase des Auges sowie die optimalen optischen Bedingungen aufrecht erhalten (Besharse & Bok, 2011). Da das Gewebe innerhalb des Auges mit Nährstoffen versorgt und Ionen über die Blut-Augen-Schranke transportiert werden müssen, sind selektive Transportmechanismen in der Barriere notwendig (Törnquist, Alm, & Bill, 1990).

Die Blut-Augen-Schranke besteht aus zwei Barrieren (Abb. 3): der Blut-Kammerwasser-Schranke (engl. *blood-aqueous barrier*) im anterioren Teil des Auges und der Blut-Netzhaut-Schranke (engl. *blood-retinal barrier*) im posterioren Teil des Auges (Cunha-Vaz, 1979). Die Blut-Kammerwasser-Schranke bestimmt den Substanztransport zwischen dem Blut und den intraokularen Flüssigkeiten (Cunha-Vaz, 1979). Sie wird von den Endothelzellen der Blutgefäße der Iris und der nicht-pigmentierten, inneren Zellschicht der Ziliarepithels, welches dem Ziliarkörper aufliegt, gebildet (Smith & Rudt, 1975; Smith, 1971). Von der Blut-Kammerwasser-Schranke werden vor allem Substanzen zurück gehalten, welche die Transparenz der Flüssigkeiten im Auge beeinträchtigen und das osmotische und chemische Gleichgewicht der intraokularen Flüssigkeiten stören würden (Cunha-Vaz, 1997).

Die Blut-Netzhaut-Schranke stellt die zweite Barriere dar. An ihr treten hauptsächlich metabolische Abfallprodukte aus dem Auge in die Blutbahn ein (Cunha-Vaz, 1979). Sie wird weiter in eine innere und eine äußere Blut-Netzhaut-Schranke unterteilt. Die innere Blut-Netzhaut-Schranke wird von Endothelzellen der retinalen Blutgefäße und den Müllerzellen der Netzhaut gebildet (Cunha-Vaz, 1979). Die Endothelzellen der retinalen Blutgefäße sind nicht fenestriert und haben wenige Vesikel (Besharse & Bok, 2011). Zudem haben sie sogenannte *zonulae oculends* (Cunha-Vaz, Shakib, & Ashton, 1966), welche aus komplex, gürtelartig angeordneten *tight junctions* bestehen, so dass ein parazellulärer Transport von Substanzen unterbunden ist (Cunha-Vaz, 1997). Verstärkt wird die innere Blut-Netzhaut-Schranke durch Astrozyten und Müllerzellen, die Zellausläufer an die Blutgefäßwand ausstrecken und die Schranke in ihrer Funktion unterstützen (Besharse & Bok, 2011). Die äußere Blut-Netzhaut-Schranke wird vom RPE gebildet (Cunha-Vaz, 1997). Auch die Zellen des RPE haben ausgeprägte *zonulae oculentes* (Cunha-Vaz, 1997). Über die äußere Blut-Netzhaut-Schranke werden vor allem Ionen und Wasser transportiert (Besharse & Bok, 2011).

Darüber hinaus gibt es eine metabolische Schranke, die durch bestimmte Enzyme (z. B. *angiotensin converting enzyme*, γ -GTP, *pseudocholinesterase* und *monoaminoxidase*) gebildet wird und ausschließlich in den retinalen Endothel- und Pigmentepithelzellen vorkommt (Cunha-Vaz, 1997).

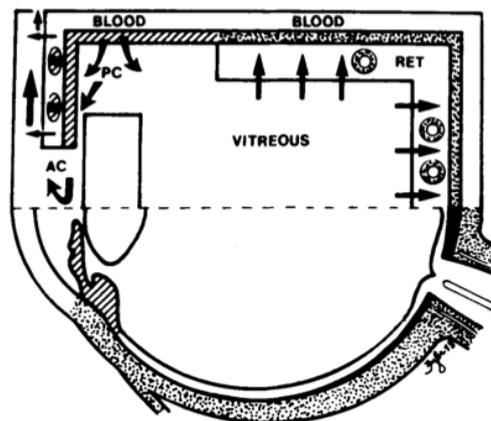


Abbildung 3: Schema der Blut-Augen-Schranke. Die Blut-Augen-Schranke besteht aus zwei Barrieren, der Blut-Kammerwasser-Schranke im anterioren Teil des Auges und der Blut-Netzhaut-Schranke im posterioren Teil des Auges. Sie dienen dazu den unregulierten Substanz Austausch zwischen Blut und Auge zu unterbinden. Da es keine weitere Barriere zwischen dem Kammerwasser der vorderen und hinteren Augenkammer, sowie dem Glaskörper und der Extrazellulärflüssigkeit der Netzhaut gibt, bilden die Blut-Netzhaut- und die Blut-Kammerwasser-Schranke eine funktionale Einheit und können nur gemeinsam das innere Milieu des Auges aufrecht erhalten. blood: Blut; Ret: Netzhaut; Vitreous: Glaskörper; AC: vordere Augenkammer; PC: hintere Augenkammer; (Quelle: Cunha-Vaz, 1997)

Da es keine weitere Barriere zwischen dem Kammerwasser der vorderen und hinteren Augenkammer, sowie dem Glaskörper und der Extrazellulärflüssigkeit der Netzhaut gibt, bilden die Blut-Netzhaut- und die Blut-Kammerwasser-Schranke eine funktionale Einheit und können nur gemeinsam das innere Milieu des Auges aufrecht erhalten (Cunha-Vaz, 1997).

Die Blut-Augen-Schranke im Vogel

Das Auge eines Vogels entspricht im Grundaufbau dem eines Säugetierauges (Sturkie, 1986). Eine Besonderheit sei jedoch in Bezug auf die Blut-Augen-Schranke erwähnt. Anders als die Säugetiernetzhaut ist die Netzhaut eines Vogels avaskulär. Die Versorgung der inneren Netzhaut erfolgt über das Pekten (*Pecten oculi*) (Amemiya, 1983). Das Pekten ist ein gefaltetes vaskuläres Organ im Auge des Vogels, das im Papillenbereich befestigt ist und fächerförmig in den Glaskörper hineinragt (Abb. 4). Da auch im Pekten eine Kontaktstelle zwischen Blutkreislauf und Auge vorhanden ist, muss eine Barriere entsprechend der inneren Blut-Netzhaut-Schranke vorhanden sein. Diese wird von dem Endothel des Pektens gebildet (Gerhardt, Liebner, & Wolburg, 1996). Die anderen beiden Blut-Augen-Schranken scheinen wie auch bei Säugern vom RPE und der nicht-pigmentierten, inneren Zellschicht des Ziliarepithels gebildet zu werden (Smith & Raviola, 1983; Williams & Rizzolo, 1997).

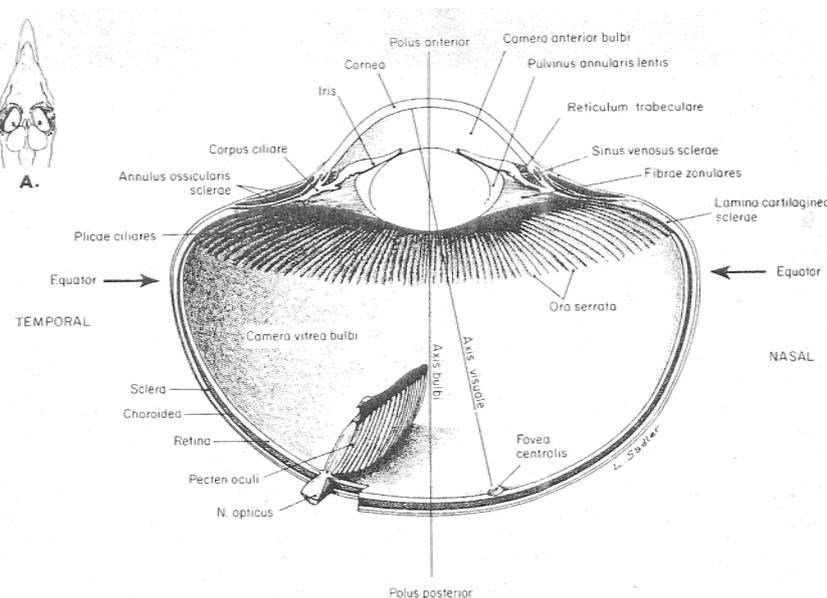


Abbildung 4: Zeichnung eines horizontalen Querschnitts durch das Hühnerauge. Das Auge eines Vogels entspricht im Grundaufbau dem eines Säugetierauges. Anders als die Säugetiernetzhaut ist die Vogelnetzhaut avaskulär. Die Versorgung der inneren Netzhaut erfolgt über das Pekten. Auch im Pekten muss daher eine Blut-Netzhaut-Schranke ausgebildet sein. (Quelle: Sturkie et al. (1986))

1.1.4 Emmetropisierung: die postnatale Refraktionsentwicklung

Bei Geburt sind die Augen der meisten Kinder nicht emmetrop, die Refraktion variiert stark (Cook & Glasscock, 1951). Sowohl Hornhaut als auch Linse sind bei Neugeborenen im Vergleich zur Hornhaut und Linse von ausgewachsenen Augen stark gekrümmt (Norton, 1999). Die starke Krümmung führt dazu, dass das scharfe Bild des Objektes zwar nah an der Hornhaut, jedoch aufgrund der geringen Länge des Auges hinter der Netzhaut abgebildet wird. Kleinkinder sind daher meistens weitsichtig. Im Laufe der ersten Lebensjahre verringert sich der Refraktionsfehler (Mayer, Hansen, Moore, Kim, & Fulton, 2001) und die Refraktionsunterschiede zwischen den Kindern nehmen ab (Mayer et al., 2001). Die Anpassung der Refraktion erfolgt, indem die Hornhaut abflacht (Norton, 1999), die Brechkraft der Linse stetig abnimmt (Jones et al., 2005) und das Auge für weitere zwei Jahrzehnte wächst (Morgan, Ohno-Matsui, & Saw, 2012). Das Wachstum der Augenlänge scheint dabei aktiven Regulationsmechanismen zu unterliegen, während die Entwicklung der Hornhaut und der Linse dies nicht zu sein scheinen (Mutti et al., 1998; Zadnik, Mutti, Fusaro, & Adams, 1995). Durch diese Prozesse kommt es im Laufe der Entwicklung dazu, dass die Brechkraft des dioptrischen Apparates bei Fernakkommodation mit der Augenlänge übereinstimmt, so dass parallel am Auge ankommende Lichtstrahlen auf der Netzhaut fokussiert werden und ein scharfes Bild der Umwelt auf der Netzhaut abgebildet wird. Der Vorgang der Anpassung der Refraktion in der Entwicklung wird als Emmetropisierung bezeichnet.

Eine ähnliche Abstimmung zwischen Brechkraft des optischen Apparates und Länge des Auges konnte auch bei Affen, Eulen und Hühnern beobachtet werden (Schaeffel, 2002).

Die Abstimmung der Brechkraft des dioptrischen Apparates und der Achsenlänge des Auges ist sehr genau und liegt beim Menschen im Bereich von ca. 100 μm (Schaeffel, 2002). Eine Fehl Abstimmung der Achsenlänge im menschlichen Auge um 1 mm würde bereits einen Refraktionsfehler von 3 D hervorrufen (Norton, 1999). Ein aktiver Regulationsmechanismus für das Wachstum des Auges scheint für diese präzise Abstimmung erforderlich (Wallman & Adams, 1987).

1.1.5 Fehlsichtigkeit (Ametropie)

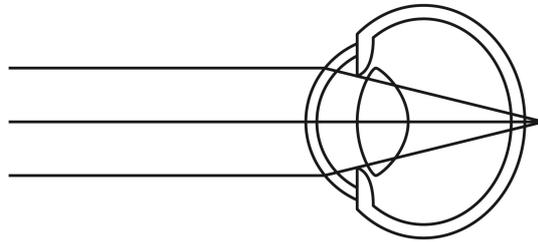
Kommt es zu einer Fehl Abstimmung zwischen Brechkraft und Augenlänge spricht man von einem ametropen Auge. Unterschieden wird zwischen einem weitsichtigen (hyperopen) und einem kurzsichtigen (myopen) Auge.

Weitsichtigkeit (Hyperopie)

Eine Form der Ametropie ist die Weitsichtigkeit (Hyperopie). Weitsichtigkeit resultiert aus einem in der Entwicklung zu kurz gewachsenen Auge oder durch eine zu schwach

gekrümmte Hornhaut. Beide Möglichkeiten führen dazu, dass ein scharfes Bild hinter der Netzhaut entsteht (Abb. 5A).

A



B

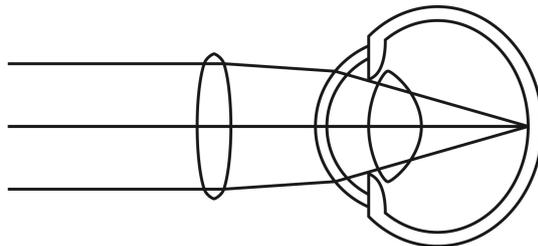


Abbildung 5: Weitsichtigkeit. Ein weitsichtiges Auge ist in den meisten Fällen zu kurz gewachsen, die Bildebene entsteht bei Fernakkommodation hinter der Netzhaut (A). Mit Hilfe von Sammellinsen kann der hyperope Refraktionsfehler korrigiert werden (B). (Abbildung verändert, Quelle: Kurzlehrbuch Augenheilkunde, Hahn, Thieme Verlag, 2012)

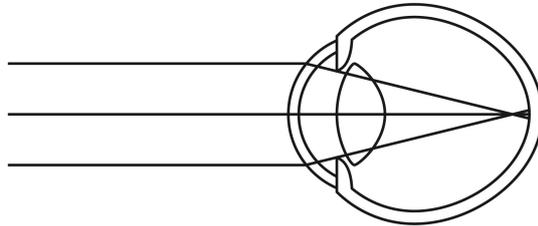
Durch Akkomodation kann die Brechkraft der Linse jedoch erhöht werden, sodass Gegenstände in der Ferne scharf abgebildet werden können. Für die Naheinstellung reicht die Akkomodationskraft jedoch nicht mehr aus. Weitsichtigkeit kann durch das Tragen einer konvexen Linse (Sammellinse) vor dem Auge korrigiert werden (Abb. 5B).

Kurzsichtigkeit (Myopie)

In einem kurzsichtigen (myopen) Auge, kommt es dazu, dass parallel zur optischen Achse verlaufende Lichtstrahlen vor der Netzhaut fokussiert werden. In über 90% der Fälle ist ein Auge kurzsichtig, weil das Auge überproportional lang gewachsen ist (Abb. 6A). Möglich ist aber auch, dass die Krümmung der Hornhaut zu stark ausfällt. Anders als bei weitsichtigen Augen kann der Mensch Kurzsichtigkeit nicht durch Akkomodation ausgleichen. Myopie kann durch konkave Linsen (Streulinsen, Abb. 6B) oder durch einen chirurgischen Eingriff, der die Hornhautkrümmung reduziert, korrigiert werden. Jedoch gibt es bis heute keine Behandlungsmöglichkeit, welche die Entstehung oder die Progression von Kurzsichtigkeit aufhalten kann (Russo et al., 2013). Zudem ist ein verlängertes Auge mit weiteren Risiken verbunden: das Glaukomrisiko verdoppelt sich, das Kataraktrisiko wird doppelt bis fünf mal

so hoch, die Gefahr der Netzhautablösung ist um den Faktor zehn erhöht und ähnliches gilt für das Risiko an chorio-retinaler Degeneration zu erkranken (Schaeffel, 2002).

A



B

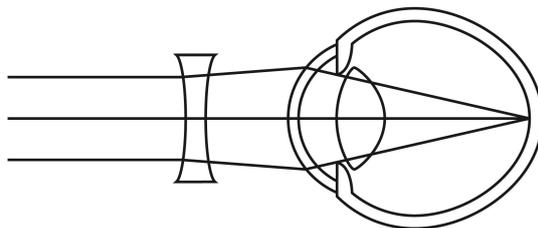


Abbildung 6: Kurzsichtigkeit. Ein kurzsichtiges Auge ist in den meisten Fällen zu lang gewachsen, die Bildebene entsteht bei Fernakkomodation vor der Netzhaut (A). Mit Hilfe von Streulinsen kann der myope Refraktionsfehler korrigiert werden (B). (Abbildung verändert, Quelle: Kurzlehrbuch Augenheilkunde, Hahn, Thieme Verlag, 2012)

Myopie kann basierend auf ihrem Ausmaß und den resultierenden Folgen in zwei grobe Klassen unterteilt werden (Norton, 1999).

Als pathologische Myopie, degenerative Myopie oder maligne Myopie werden Refraktionsfehler ab -6 D oder mehr bezeichnet (Norton, 1999). Pathologische Myopie kann nicht nur im Kindesalter, sondern auch noch in den späten Teenagerjahren bzw. frühem Erwachsenenalter in Erscheinung treten (Cumberland, Peckham, & Rahi, 2007). Oft sind pathologisch myope Augen nicht nur zu lang, sondern auch deformiert (Moriyama et al., 2011): durch das starke Augenwachstum können am posterioren Pol der Lederhaut Ausbeulungen entstehen die zu Netzhautrissen und Netzhautablösungen führen können. Für die Entstehung der pathologischen Myopie sind oft erbliche Faktoren verantwortlich. Es sind bereits über 20 Genmutationen beschrieben, die mit hoher Myopie assoziiert sind (Hornbeak & Young, 2009; Wojciechowski, 2011).

Die andere Klasse der Myopie wird als einfache Myopie, Myopia simplex oder auch Schulmyopie bezeichnet und umfasst niedrige bis moderate Refraktionsfehler bis ca. -6 D (Norton, 1999). Diese Form der Kurzsichtigkeit entwickelt sich meist nach dem sechsten Lebensjahr und basiert wie die pathologische Myopie auf einem zu lang gewachsenen Auge, da meist der Glaskörper zu stark gewachsen ist (Morgan et al., 2012; Norton, 1999). Mit

einer Wahrscheinlichkeit von weniger als zehn Prozent wird ein Kind, dessen Eltern emmetrop sind kurzsichtig (Norton, 1999). Ist ein Elternteil kurzsichtig verdoppelt sich das Risiko auf ca. 20-25% (Norton, 1999; Schaeffel, 2002). Sollten beide Elternteile eines Kindes kurzsichtig sein steigt das Risiko auf ca. 30-40% an (Norton, 1999; Schaeffel, 2002). Dass die Wahrscheinlichkeit kurzsichtig zu werden lediglich durch Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten, die für Eltern und deren Kinder meistens sehr ähnlich sind, bestimmt wird, konnte jedoch durch die Orindastudie ausgeschlossen werden (Schaeffel, 2002). Bislang wurde von keinen Genen berichtet, die für Schulmyopie ursächlich sein könnten (Morgan et al., 2012).

Die Myopieprävalenz varriert stark zwischen einzelnen Regionen und Bevölkerungsgruppen (Kempen et al., 2004; Lee, Klein, Klein, & Wong, 2002). Über 30% der über 35-jährigen Europäer (Wolfram et al., 2014) und über 40% der US-Amerikaner im Alter von 12 bis 54 Jahren sind kurzsichtig (Vitale, Sperduto, & Ferris, 2009). Deutlich höher ist die Myopieprävalenz mit über 75% unter den Studienabsolventen in industrialisierten Ländern Asiens (Wallman & Winawer, 2004). Es wurde ein rasanter Anstieg der Myopiehäufigkeit in den letzten 50 bis 60 Jahren festgestellt (Foster & Jiang, 2014; Pan, Ramamurthy, & Saw, 2012; Rose et al., 2008; Vitale et al., 2009). Der Anstieg der Myopieprävalenz scheint nicht durch genetische Ursachen auf einzelne Bevölkerungsgruppen beschränkt zu sein, wie der Anstieg der Myopieprävalenz in allen drei großen ethnischen Bevölkerungsgruppen in Singapur zwischen 1987 und 1992 von ca. 35% auf 70% verdeutlicht (Morgan et al., 2012).

Die starke und schnelle Zunahme der Myopiehäufigkeit in einigen Ländern deutet darauf hin, dass unter anderem Umweltfaktoren maßgeblich für die Entstehung von Kurzsichtigkeit verantwortlich sind.

1.2 Wodurch wird das Augenwachstum reguliert?

1.2.1 Umweltfaktoren die mit der Refraktionsentwicklung assoziiert werden

Wie die erwähnte epidemische Zunahme der Myopie in ostasiatischen Ländern und wahrscheinlich auch in westlichen Industrienationen gibt es weitere Hinweise dafür, dass die Entstehung von Kurzsichtigkeit nicht ausschließlich durch genetische Faktoren erklärt werden kann.

Einen Hinweis liefert der Zusammenhang zwischen dem Bildungsgrad und der Myopieprävalenz, der in verschiedenen Ländern festgestellt werden konnte: die Myopieprävalenz steigt mit zunehmendem Bildungsgrad (z. B. (Goldschmidt, 1968)). Weiter

wurde beobachtet, dass Studenten, die ein Studium absolvierten, dass sehr lernintensiv war, während ihres Studiums mit hoher Wahrscheinlichkeit kurzsichtig wurden (z. B. (Zadnik & Mutti, 1987)). Eine Tätigkeit, die vom Bildungsgrad abhängt und die die Entstehung von Kurzsichtigkeit beeinflussen könnte ist der Vorgang des Lesens. Da sich die Seite, die man liest, in geringem Abstand zum Auge befindet ist das Auge einem kontinuierlichen hyperopen Defokus ausgesetzt. Obwohl Akkomodation den hyperopen Defokus ausgleicht, kann es diesen nicht vollständig unterbinden, da der hyperope Defokus das Fehlersignal für die negative Feedbackschleife ist, unter der die Akkomodation gesteuert wird (Wallman & Winawer, 2004). Eine weitere Erklärung wäre, dass es durch lange Naharbeit (z. B. Lesen) zu einer Ermüdung des Ziliarmuskels kommt, sodass die Linse ihre maximale Brechkraft nicht mehr erreicht und die Bildebene hinter der Netzhaut zu liegen kommt (Morgan et al., 2012) (engl. *accommodative lag*). Obwohl gezeigt werden konnte, dass myope Kinder einen größeren *accommodative lag* haben als emmetrope Kinder (Gwiazda, Thorn, Bauer, & Held, 1993) ist weiter fraglich, ob dies ursächlich für Myopie ist oder aus Myopie resultiert. Beide Theorien werden durch Linsenexperimente im Tiermodell gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass ein hyperoper Defokus ein starkes Wachstumssignal für das Auge darstellte (siehe Kapitel 1.2.2: Hinweise durch Linsenexperimente). Es gibt jedoch auch Studien die keine Assoziation zwischen der Zeit, die mit Naharbeit verbracht wird, und der Myopieprävalenz nachweisen konnten (z. B. (Mutti, Mitchell, Moeschberger, Jones, & Zadnik, 2002)). Darüber hinaus wurde in Tierexperimenten festgestellt, dass der Effekt eines hyperopen Defokusses nicht ins Gewicht fiel, wenn der hyperope Defokus durch emmetrope Phasen des Sehens unterbrochen wurde, wie es beispielsweise beim Lesen der Fall ist (siehe Kapitel 1.2.2 Hinweise durch Linsenexperimente - Gewichtung).

Es konnten verschieden hohe Myopieprävalenzen in Städten und ländlichen Gegenden nachgewiesen werden, die vom genetischen Hintergrund unabhängig waren (Garner, Owens, Kinnear, & Frith, 1999): die Myopieprävalenz der Kindern in Tibet und Nepal, die in ländlichen Gegenden aufwachsen fiel deutlich geringer aus, als die der Kinder, die in den dortigen Städten aufwachsen.

Es konnte dargelegt werden, dass der Aufenthalt im Freien und Sport protektiv gegen die Entstehung von Kurzsichtigkeit wirkte (Jones et al., 2007). Denkbar wäre, dass hohe Lichtintensitäten im Freien zu einer kleineren Pupille führen, wodurch eine größere Tiefeschärfe resultiert und dadurch ein schärferes Bild auf der Netzhaut entsteht (Rose et al., 2008). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die hohe Lichtintensität im Freien durch eine Verstärkte Dopaminausschüttung vor Myopie schützt. Dopamin verringerte das Augenlängenwachstum im Tiermodell (McCarthy, Megaw, Devadas, & Morgan, 2007).

Cordain et al. (2002) argumentiert, dass die Ernährung ein entscheidender Faktor sein könnte, der zur Entstehung von Kurzsichtigkeit beitragen kann. Er bezieht sich dabei vor allem auf den schnellen und starken Anstieg der Myopieprävalenz in Bevölkerungsgruppen, die erst seit geraumer Zeit Zugang zur westlichen Kultur haben. Laut Cordain steigt durch den Kontakt zur westlichen Welt vor allem der Konsum von prozessierter Stärke und Zucker, wodurch Insulinresistenz und Hyperinsulinämie gefördert werden. Der Wissenschaftler postuliert, dass übermäßiges systemisches Insulin (verursacht durch Insulinresistenz und Hyperinsulinämie) die Synthese des Insulin-like growth factor binding Protein 1 (IGFBP-1) (Abb. 7) in der Leber unterdrückt. Dies könnte zu einer erhöhten Konzentration von ungebundenem und aktiven *insulin-like growth factor 1* (Abk. IGF-1) führen. IGF-1 ist in vielen Geweben, u. a. auch in den skleralen Chondrozyten und Fibroblasten ein potenter Stimulator der Zellproliferation (Seko, Tanaka, & Tokoro, 1995). Freies IGF-1 mindert über eine negative Rückkopplung die Konzentration von Wachstumshormonen und IGFBP-3, ein weiteres *insulin-like growth factor binding protein*.

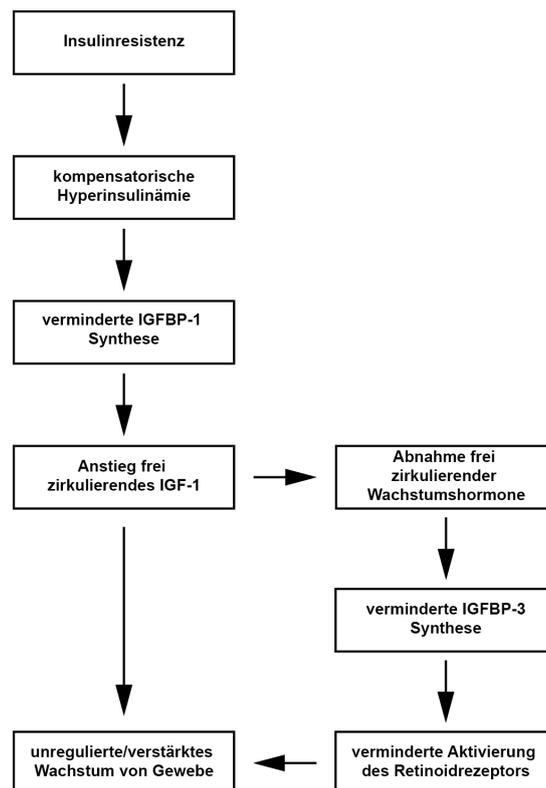


Abbildung 7: Cordains Theorie zur Entstehung von Kurzsichtigkeit. Laut Cordain (2002) könnte es durch eine stetige Zufuhr von veredelter Stärke und Zucker zu einer Insulinresistenz und zu Hyperinsulinämie kommen. Die zu hohe Insulinkonzentration im Blut könnte zu einer überproportional hohen Konzentration an IGF-1 und zu einer zu geringen Konzentration an IFGBPs führen, woraus ein unreguliertes und verstärktes Wachstum von Gewebe, vor allem der Lederhaut, resultieren könnte, sodass ein zu langes myopes Auge entsteht. (Quelle: Cordain, 2002)

Er argumentiert, dass geringe IGFBP-3 Konzentrationen zu unregulierter Zellproliferation in der Lederhaut führen könnten, da IGFBP-3 inhibitorisch auf das Wachstum wirkt, indem es verhindert, dass IGF-1 an seinen Rezeptor bindet. Außerdem ist IGFBP-3 ein Ligand des Retinoidrezeptors vom Typ RXR, der nach Aktivierung zur Genexpression von wachstumslimitierenden Genen führt. Cordain schlussfolgert, dass das durch den Anstieg von Insulin und IGF-1 sowie die verminderte Aktivierung des Retinoidrezeptors das Wachstum der Lederhaut angeregt werden könnte und dieses in einem verlängerten und damit myopen Auge resultieren könnte.

Bevölkerungsgruppen, die bislang eine traditionelle Lebensweise geführt haben und ihre Lebensweise innerhalb kürzester Zeit an die der westlichen Kultur anpassen, erfahren Veränderungen in allen oben genannten Umweltfaktoren. Auch wenn die Myopieprävalenz innerhalb einer solchen Population im Laufe einer Generation nach Kontakt zur westlichen Kultur um das vierfache ansteigen kann (Bear, 1991), ist schwer einen Umweltfaktoren von den anderen zu trennen und als möglichen Stimulator für die Myopieentstehung zu benennen.

1.2.2 Hinweise durch Linsenexperimente

Verschiedene Tiermodelle, beispielsweise das Spitzhörnchen (Sherman, Norton, & Casagrande, 1977), der Affe (Wiesel & Raviola, 1977) sowie das Huhn (Wallman, Turkel, & Trachtman, 1978), wurden in den Siebziger Jahren etabliert, um die Emmetropisierung zu untersuchen, nachdem entdeckt wurde, dass der Lidverschluss beim Affen zu einer Zunahme des Augenlängenwachstums und dadurch zu einem myopen Auge führte (Wiesel & Raviola, 1977). Die Emmetropisierung dieser Tiere ähnelt stark der Emmetropisierung des Menschen (Norton, 1999). Da das Wachstum des Auges von visuellen Stimuli - wahrscheinlich der Unschärfe des Bildes auf der Netzhaut - getrieben und reguliert wird werden unter anderem Mattgläser, Streu- oder Sammellinsen vor den Augen befestigt, um die Position der Bildebene zu manipulieren und das Augenwachstum infolge der Linsenbehandlung studieren zu können.

Streulinsen imitieren im Tiermodell den Zustand der Naharbeit (Morgan et al., 2012), der wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben häufig als ein potentieller Faktor bei der Entstehung von Kurzsichtigkeit erwähnt wird. Das Vorhandensein einer Streulinse vor dem Auge führt dazu, dass die Bildebene hinter der Netzhaut zu liegen kommt (Abb. 8, hyperoper Defokus). Damit Bildebene und Netzhaut erneut zur Deckung kommen muss die Netzhaut in Richtung Bildebene verlagert werden. Dies geschieht in den oben genannten Tiermodellen unter anderem durch eine Reduktion der Aderhautdicke innerhalb weniger Stunden nach

Behandlungsbeginn. Zudem wird das Augenwachstum, insbesondere das Wachstum der Glaskammertiefe beschleunigt (Wallman & Adams, 1987) und die Lederhaut am posterioren Pol neu modelliert (McBrien, Gentle, & Cottrill, 1999; Nickla, Wildsoet, & Wallman, 1997). Ein Vorgang der mit einer verstärkten Glykosaminoglykan (GAG)-Synthese, ein Maß für die sklerale Proteoglykansynthese, einhergeht (Nickla et al., 1997). Ein bis zwei Tage sind nötig, damit die Linse die Wachstumsgeschwindigkeit des Auges beeinflussen kann (Kee, Marzani, & Wallman, 2001). Sowohl die Reduktion der Aderhautdicke als auch das verstärkte Wachstum der Glaskörpertiefe führt dazu, dass die Netzhaut vom anterioren Pol des Auges weg bewegt wird (Wallman & Winawer, 2004; Wildsoet & Wallman, 1995). Sobald das Bild erneut scharf auf der Netzhaut abgebildet wird, normalisieren sich Aderhautdicke und Wachstumsgeschwindigkeit. In diesem Fall handelt es sich somit um einen geschlossenen Regelkreis. Das nach Linsenkompensation myope Auge ähnelt in seiner Morphologie stark einem kurzsichtigen menschlichen Auge (Norton, 1999).

Werden Mattgläser vor dem Auge eines Tieres angebracht, werden hohe Ortsfrequenzen durch das Mattglas herausgefiltert und der Kontrast des Bildes reduziert. Als Folge wird die Aderhaut dünner und das Auge wächst (Wallman et al., 1978). Hauptsächlich wird die Glaskörpertiefe größer, sodass der resultierende Glaskörper bis zu 25% länger sein kann, als der Durchschnitt (Wallman & Adams, 1987). Diese Form der Myopie wird auch als Deprivationsmyopie bezeichnet. Deprivationsmyopie entsteht in allen Tierarten, die in der Myopieforschung eingesetzt werden. Da das Bild auf der Netzhaut durch das Wachstum des Auges nicht verbessert werden kann handelt es sich um einen offenen Regelkreis.

Obwohl sowohl Mattgläser als auch Streulinsen Myopie hervorrufen unterscheiden sie sich in einigen Punkten, wie dem zeitlichen Verlauf der biochemischen Veränderungen (Kee et al., 2001), im Dopaminmetabolismus (Schaeffel, Bartmann, Hagel, & Zrenner, 1995), im Verhalten bei konstantem Licht (Bartmann, Schaeffel, Hagel, & Zrenner, 1994) und im Wachstum nach der Durchtrennung des Sehnervs (Wildsoet, 2003).

Wird eine Sammellinse vor einem Auge angebracht, verlagert dies die Bildebene bei Fernakkommodation vor die Netzhaut (myoper Defokus). Um dies zu kompensieren verlangsamt sich das Wachstum des Auges, vor allem der Glaskörpertiefe (Hung, Crawford, & Smith, 1995; Irving, Callender, & Sivak, 1995; Norton, 1999; Schaeffel & Howland, 1988) und die Aderhaut wird dicker (Wildsoet & Wallman, 1995; Abb. 8). Beide Vorgänge dienen ebenfalls dazu Bildebene und Netzhaut zusammenzuführen. Anders als bei der Behandlung mit Streulinsen führt die Behandlung mit Sammellinsen zu einer verringerten GAG-Synthese in der Lederhaut (Nickla et al., 1997). Da Hornhaut und Linse während dem Tragen einer Sammellinse weiter wachsen, verlagert sich die Bildebene im Laufe der Zeit in Richtung

Netzhaut. Die Prozesse, die zu einem verlangsamten Wachstum des Auges führen, sind potentiell interessant um herauszufinden wie die Entstehung von Kurzsichtigkeit oder die Verstärkung der Kurzsichtigkeit unterbunden werden könnte (Morgan et al., 2012).

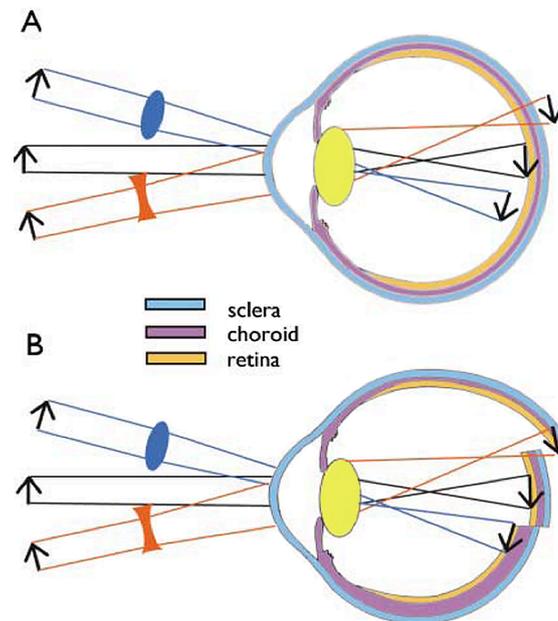


Abbildung 8: Anpassung der Augenlänge und Aderhautdicke zur Kompensation von Sammell- und Streulinsen. (A) In einem emmetropen Auge entsteht bei Fernakkommodation ein scharfes Bild eines sich in weiter Ferne befindlichen Objektes auf der Netzhaut. Das Vorhandensein einer Sammellinse (blau) vor dem Auge führt zu einem myopen Defokus. Im Gegensatz dazu führt das Vorhandensein einer Streulinse zu einem hyperopen Defokus. (B) Das Auge kompensiert die Sammellinse durch ein verlangsamtes Augenwachstum und durch eine dickere Aderhaut, sodass die Netzhaut in Richtung Bildebene bewegt wird. Negativlinsen werden kompensiert, indem das Augenwachstum verstärkt und die Aderhaut dünner wird, sodass die Netzhaut in Richtung Bildebene bewegt wird. (Quelle: Wallman et al., 2004)

Sobald sich das Auge der vorgesetzten Linse angepasst hat und die Bildebene mit der Netzhaut erneut zur Deckung gekommen ist normalisiert sich die Wachstumsrate des Auges und die Dicke der Aderhaut, solange die Linse weiterhin getragen wird (Morgan et al., 2012). Wird die Linse abgenommen liegt nach vorherigem myopen Defokus ein hyperopes Auge, nach vorherigem hyperopen Defokus ein myopes Auge vor. Wachstumsrate und Aderhautdicke werden daraufhin erneut den vorhandenen Gegebenheiten angepasst, sodass innerhalb weniger Tage eine „Re-Emmetropisierung“ erfolgt (Liang, Crewther, Crewther, & Pirie, 1996; Wallman & Adams, 1987).

Die Brechkraft der Linse, die kompensiert werden kann ist in Hühnern größer als in Affen (Wallman & Winawer, 2004). Dies liegt unter anderem daran, dass Hühner die Dicke ihrer Aderhaut stärker verändern können (bis zu ca. 300 μm ; (Wallman & Winawer, 2004)) und

das Hühnerauge schneller wächst (innerhalb von zwei Tagen bis zu 300 μm ; (Wallman & Winawer, 2004)).

Die Zunahme der Aderhautdicke geschieht in Hühnern hauptsächlich durch die Ausdehnung von Lakunen im Stroma der Aderhaut (Junghans, Crewther, Liang, & Crewther, 1999). Enorme Flüssigkeitsbewegungen zwischen dem Glaskörper und der Aderhaut konnten während der Verdickung der Aderhaut beobachtet werden (Junghans et al., 1999). Welcher Mechanismus die Flüssigkeitsbewegung und damit die Ausdehnung der Lakunen verursacht ist nicht eindeutig geklärt. Vorstellbar ist, dass die Osmolarität in den Lakunen steigt und dadurch vermehrt Wasser in die Lakunen einströmt. Auch wäre es möglich, dass der Flüssigkeitstransport zur und von der Aderhaut kontrolliert wird, oder, dass glatte Muskulatur in der Aderhaut für eine schnelle Änderung der Dicke verantwortlich ist (Wallman & Winawer, 2004).

Gewichtung

Hyperoper und myoper Defokus scheinen unterschiedlich stark bei der Emmetropisierung des Auges ins Gewicht zu fallen. Der myope Effekt der Mattgläser konnte durch Intervalle, in denen die Mattgläser abgenommen wurden („normales, emmetropes Sehen“), verringert werden (Napper et al., 1995). Eine vollständige Unterbindung des myopen Effekts der Mattgläser fand bereits nach ein bis zwei Stunden normalen Sehens statt (Napper et al., 1995). Werden abwechselnd Streu- und Sammellinsen vor demselben Auge angebracht, kompensierte sich der Effekt der Linsen nicht. Selbst wenn der hyperope Defokus fünf mal länger als der myope Defokus präsentiert wurde, dominierte der Effekt der Sammellinse auf das Augenwachstum (Winawer & Wallman, 2002). Das durch die Sammellinse, bzw. das durch die Abnahme der Mattgläser entstandene Signal muss schnell generiert und lang wirksam sein, um das Signal der Streulinsen bzw. der Mattgläser zu unterdrücken (Morgan, 2003).

1.2.3 Welche Moleküle steuern das Augenlängenwachstum?

Offenbar scheint bereits die Netzhaut das Vorzeichen des durch Linsen auferlegten Refraktionsfehlers detektieren zu können (Schaeffel & Diether, 1999; Zhu, Park, Winawer, & Wallman, 2005). Weder Akkomodation noch die Bildprozessierung im Gehirn scheinen nötig zu sein, um das Wachstum des Auges zu steuern: nach Läsion des Edinger-Westphal Nukleus, der für die Nahakkomodation notwendig ist, wurden Linsen weiterhin kompensiert (Schaeffel, Troilo, Wallman, & Howland, 1990). Auch die Durchtrennung des Sehnervs und die Blockierung von Aktionspotentialen im Sehnerv verhinderten nicht die Kompensation der Linsen, auch wenn geringe Unterschiede ersichtlich waren: die Kompensation eines myopen Defokusses war nach Sehnervdurchtrennung möglich, während bei der Kompensation eines

hyperopen Defokusses durch Mattgläser der Sollwert des Regelkreises zur Kompensation der Linse aufgrund der Sehnervdurchtrennung verändert war (Wildsoet & Wallman, 1995; Wildsoet, 2003). Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Netzhaut für die Steuerung des Augenlängenwachstums verantwortlich ist, ist der Befund, dass nur der Teil des Auges der durch eine Linse bedeckt wurde den Defokus kompensierte (Diether & Schaeffel, 1997; Wallman & Adams, 1987). Auch diese Befunde schließen einen zentralen Mechanismus (z. B. Akkomodation) für die Steuerung des Augenlängenwachstums aus.

Wie die Netzhaut das Vorzeichen des Defokuses erkennt ist bisher nicht eindeutig geklärt. Dass die Netzhaut zufällig in die eine oder andere Richtung verschoben wird kann ausgeschlossen werden, da Zhu et al. (2005) zeigen konnten, dass die korrekte Wachstumsrichtung bereits innerhalb weniger Minuten von der Netzhaut bestimmt werden kann.

Die Vorstellung ein einziges von der Netzhaut freigesetztes Molekül sei in der Lage die *tight junctions* des RPEs zu überwinden, sowie im konstanten Blutstrom der Aderhaut nicht zu stark verdünnt zu werden um einen Effekt auf das RPE, die Aderhaut, und/oder die Sklera ausüben zu können, scheint unwahrscheinlich (Wallman & Winawer, 2004). Sehr wahrscheinlich werden Signale von der Netzhaut ausgehend über eine Signalkaskade an die Gewebsschichten weitergegeben. Mögliche Signale, die an der Signalkaskade beteiligt sind, sind das Vasoaktive intestinale Peptid (VIP) (Seltner & Stell, 1995; Stone, Laties, Raviola, & Wiesel, 1988), Glukagon (Buck, Schaeffel, Simon, & Feldkaemper, 2004; Feldkaemper & Schaeffel, 2002; Vessey, Rushforth, & Stell, 2005), Dopamin (Iuvone, Tigges, Stone, Lambert, & Laties, 1991; Schaeffel, Hagel, Bartmann, Kohler, & Zrenner, 1994; Stone, Lin, Laties, & Iuvone, 1989), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (IGF)-1 (Zhu & Wallman, 2009), Insulin (Feldkaemper, Neacsu, & Schaeffel, 2009; Zhu & Wallman, 2009) und einige mehr. Auf Glukagon und Insulin soll im Folgenden eingegangen werden.

Glukagon

Da Sammel- und Streulinse eine entgegen gesetzte Wirkung auf das Wachstum des Auges haben ist eine bidirektionale Expression eines Proteins in Abhängigkeit des Defokusses eine der Eigenschaften, die eine Beteiligung an der Regulation des Augenwachstums plausibel erscheinen ließen. Die Translation und Transkription des Transkriptionsfaktors ZENK nahm bidirektional je nach Vorzeichen der Defokussierung in den glukagonergen Amakrinzellen der Netzhaut ab (Bitzer & Schaeffel, 2002; Fischer, McGuire, Schaeffel, & Stell, 1999; Simon, Feldkaemper, Bitzer, Ohngemach, & Schaeffel, 2004): die ZENK-Expression wurde durch einen myopen Defokus verstärkt und durch einen hyperopen Defokus verringert (Bitzer &

Schaeffel, 2002; Fischer et al., 1999). Diese Erkenntnis rückte Glukagon als ein potentielles, Wachstum-regulierendes Peptid ins Licht (Ashby, Kozulin, Megaw, & Morgan, 2010; Feldkaemper, Wang, & Schaeffel, 2000). Es wurde festgestellt, dass die retinale Glukagonkonzentration als Folge eines hyperopen Defokusses ab, während die choroidale Glukagonkonzentration als Folge eines myopen Defokusses zunahm (Feldkaemper & Schaeffel, 2002). Darüber hinaus änderte sich die Glukagonkonzentration in suprachoroidaler Flüssigkeit bidirektional in Abhängigkeit des Defokuses (Zhu, Feldkaemper, Fischer, & Wallman, 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass die intravitreale Gabe von Glukagon Deprivationsmyopie, bzw. durch Streulinen hervorgerufene Myopie, verhinderte (Vessey et al., 2005) und ein Glukagonantagonist die Hyperopieentwicklung als Folge von Sammellinsenbehandlungen unterband (Feldkaemper & Schaeffel, 2002). Glukagon könnte daher als Stopp-Signal für das Augenwachstum fungieren (Feldkaemper et al., 2009).

Insulin

Insulin ist der Gegenspieler zu Glukagon im Glukosemetabolismus. Es konnte gezeigt werden, dass Insulin in neuronalem Gewebe das Wachstum und die Entwicklung von Zellen regulieren kann (Boyd, Clarke, Muther, & Raizada, 1985; Wei, Matsumoto, & Rhoads, 1990) sowie einen entgegengesetzten Effekt zu Glukagon auf die Zellproliferation am Rand der Netzhaut hat (in der *circumferential marginal zone*) (Fischer, Omar, Walton, Verrill, & Unson, 2005). Weiter konnte gezeigt werden, dass Insulin *in vitro* auf das RPE wirkt und die Freilassung eines Botenstoffes zur Folge hatte, welcher eine relative Reduktion der Aderhautdicke verursachte (Sheng, Zhu, & Wallman, 2013). Somit ist auch Insulin als Wachstumssignal in das Interesse der Wissenschaft gerückt. Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (insulin like growth factor (IGF)-1), ist ein zu Insulin stark homologes Peptid (Sporn & Roberts, 1991), dass die Zellproliferation und -differenzierung im gesamten Körper fördert, und wurde daher ebenfalls als mögliches wachstumstimulierendes Signal näher beleuchtet.

Es ist bekannt, dass Insulin *in vivo*, wenn auch in sehr geringen Konzentrationen, sowohl in der Netzhaut als auch in der Aderhaut, vorhanden ist (Penha, Schaeffel, & Feldkaemper, 2011) und eventuell auch von der Netzhaut synthetisiert wird (Das, Pansky, & Dudd, 1987; Tesoriere et al., 1994; Tesoriere, Vento, Calvaruso, Taibi, & Giuliano, 1992). Auch IGF-1 konnte in der Netzhaut des Menschen nachgewiesen werden: in Kultur gehaltene menschliche RPE-Zellen synthetisieren IGF-1 und gaben dies frei, sodass dies eine IGF-1-Quelle *in vivo* sein könnte (Waldbillig et al., 1991).

Nicht nur die Peptide Insulin und IGF-1 sind stark homolog, auch die Rezeptoren für IGF-1 und Insulin weisen eine starke Homologie auf (Sporn & Roberts, 1991) und können beide

sowohl Insulin als auch IGF-1 mit unterschiedlicher Affinität binden (Van Wyk & Smith, 1999). Insulin-, sowie IGF-1-Rezeptoren wurden in der Netzhaut (Hyndman, 1993; Penha et al., 2011), dem RPE, der Aderhaut sowie in beiden Lederhautschichten des Huhns nachgewiesen (Penha et al., 2011). Die Konzentration der Insulin- und IGF-1-Rezeptor mRNA wird durch Linsenbehandlungen moduliert: Sammellinsen führten zu einer geringeren mRNA-Konzentration beider Rezeptoren im RPE, Streulinsen zu einer erhöhten mRNA-Konzentration beider Rezeptoren in der Aderhaut und der fibrösen Lederhaut (Penha et al., 2011).

Bindet IGF-1 oder Insulin an einen der beiden Rezeptoren folgt eine Konformationsänderung des Rezeptors. In der Zelle sind zwei zytosolische Signalwege vorhanden, die durch die Konformationsänderung des Rezeptors aktiviert werden können: der Mitogen-activated Protein Kinase/Extracellular Regulated Kinase Signalweg (Abkürzung: MAPK/Erk-Signalweg) und der PI3K-Signalweg (auch als Phosphatidylinositol-3-Kinase-AKT/Proteinkinase B Signalweg bezeichnet) (LeRoith, Werner, Beitner-Johnson, & Roberts, 1995; Penha, Burkhardt, Schaeffel, & Feldkaemper, 2012). Bindet Insulin als Ligand wird der metabolische Effekt von Insulin auf die Glucosekonzentration im Blut über den PI3K-Signalweg vermittelt. Der MAPK/Erk-Signalweg kontrolliert zusammen mit dem PI3K-Signalweg Zellwachstum und Differenzierung (LeRoith et al., 1995; Taniguchi, Emanuelli, & Kahn, 2006).

Der Effekt von intravitreal injiziertem Insulin und IGF-1

Sowohl intravitreale Insulin- als auch IGF-1-Injektionen haben einen wachstumsfördernden Effekt auf das Auge (Feldkaemper et al., 2009; Zhu & Wallman, 2009). Insulininjektionen resultierten vor allem in einer größeren Vorderkammertiefe sowie Linsendicke (Feldkaemper et al., 2009). Zudem erhöhte Insulin die sklerale Glycosaminoglycan (GAG)-Synthese (Zhu & Wallman, 2009), ein Effekt der auch bei verstärktem Augenlängenwachstum durch Streulinsen beobachtet wurde (Nickla et al., 1997; Rada, McFarland, & Cornuet, 1992; Rada, Thoft, & Hassell, 1991). Es wird vermutet, dass die verstärkte GAG-Synthese aus einem direkten Effekt des Insulins auf die Aderhaut resultierte, sodass die Aderhaut ein Molekül absonderte, welches die GAG-Synthese der Lederhaut regulierte (Sheng et al., 2013). Wird Insulin intravitreal in ein Auge mit normaler Sicht injiziert kommt es sowohl zur Aktivierung des MAPK/ERK- als auch des PI3K-Signalwegs in der Netzhaut (Penha et al., 2012).

In Kombination mit einer Linsenbehandlung entfaltete intravitreal injiziertes Insulin ebenfalls seinen wachstumsfördernden Effekt auf die Vorderkammer und Linse. Hinzu kommt, dass die kompensatorische Aderhautverdickung als Folge eines myopen Defokusses durch Insulin unterdrückt wurde (Feldkaemper et al., 2009). Je nach Höhe der Insulinkonzentration im

Glaskörper wurde die Entstehung von experimentell induzierter Weitsichtigkeit durch Insulin verhindert oder Kurzsichtigkeit induziert (Feldkaemper et al., 2009). Wird Insulin ein Sammellinsen-behandeltes Auge injiziert scheinen die beobachteten Effekte über den PI3K- und MAPK/Erk-Signalweg vermittelt zu werden (Penha et al., 2012). Intravitreal injiziertes Insulin in Kombination mit einer Streulinsenbehandlung resultierte in einer Überkompensation der Linse, wenngleich Insulin keinen zusätzlichen Effekt auf das Wachstum der Glaskörpertiefe hatte (Feldkaemper et al., 2009). Wird Insulin in eine Streulinsenbehandeltes Auge injiziert scheinen die oben beschriebenen Effekt von Insulin und Linse über den PI3K-Signalweg vermittelt zu werden (Penha et al., 2012).

Glucosekonzentration & Refraktionsfehler

Feldkaemper et al. (2009) konnten einen Effekt von intravitreal injiziertem Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers nachweisen. Es ist möglich, dass die Glukosekonzentration des Glaskörpers einen Effekt auf den Refraktionsfehler des Auges hat (Menon & Sperlin, 2003). Hyperglykämie in Diabetikern scheint die Hauptursache für transiente Refraktionsfehler zu sein (Sonmez et al., 2005): Hyperglykämie konnte mit einer verstärkten Myopieprävalenz assoziiert werden (Jacobsen, Jensen, Lund-Andersen, & Goldschmidt, 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, das eine Verschiebung des Refraktionsfehlers in Richtung Hyperopie bei Diabetikern erfolgt, wenn der Blutzuckerspiegel von hyperglykämisch auf einen normalen Zustand abgesenkt wird (Sonmez et al., 2005).

1.3 Wissenschaftliche Fragestellung

Da Insulin, wenn intravitreal injiziert, einen fördernden Effekt auf das Augenlängenwachstum hat und Cordain et al. (2002) einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Insulinkonzentration im Blut und einer daraus resultierenden Myopie postuliert, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob systemisch injiziertes Insulin dieselben Effekte wie intravitreal injiziertes Insulin auf das Wachstum des Auges und damit einhergehend auf die Emmetropisierung von Küken hat. Sollte die systemische Gabe von Insulin die Entwicklung von Kurzsichtigkeit fördern, könnten Empfehlungen für eine Umstellung der Ernährung beim Menschen entwickelt werden. Um den Einfluss einer systemischen Erhöhung der Insulinmenge zu untersuchen wurde Insulin im Laufe der Versuchswoche mehrmals systemisch (intravenös oder intraperitoneal) injiziert und die Refraktion, sowie die Längen der Kompartimente des Auges zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende gemessen. Da der Effekt von Insulin oft in Kombination mit einer Linsenbehandlung verstärkt wird, wurden einige Hühner monokular mit einer Linse behandelt.

Weiter sollte analysiert werden, ob Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren kann. Zwei Methoden wurden hierfür eingesetzt. Die Insulinkonzentration in Netzhaut und Aderhaut wurde zehn Minuten nach Insulininjektion mit Hilfe eines Insulin-ELISAs bestimmt. Darüber hinaus wurde die Aktivität der Signalwege, die durch die Bindung von Insulin an den Insulin- oder IGF-1-Rezeptor der Netzhaut aktiviert werden, zwei Stunden nach Injektion mit Hilfe eines Western-Blots analysiert.

Darüber hinaus sollte festgestellt werden, ob Insulininjektionen einen Effekt auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers sowie des Blutes haben.

2 Material und Methoden

2.1 Der Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Emmetropisierung des unbehandelten Auges und auf die Emmetropisierung mit hyperopem oder myopem Defokus

2.1.1 Tiere & Tierhaltung

Männliche white leghorn Hühner (*Gallus gallus domesticus*) wurden in den Versuchen eingesetzt. Alle Hühner wurden am Schlupftag von der Brüterei Weiss (Kirchberg) bezogen. Die Hühner wurden in Gruppen aus mindestens zwei Tieren in Käfigen mit einer Gesamtgröße von 1 m² gehalten. Die Käfige waren mit Holzspänen ausgelegt. Futter (Kükenaufzuchtfutter) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Die Tiere waren einem ca. 12/12h andauernden Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt.

2.1.2 Versuchsablauf

Zu Versuchsbeginn waren die Tiere mindestens sieben Tage alt. Am ersten Versuchstag wurde die Refraktion, die Länge der Vorderkammer, der Linse, des Glaskörpers sowie der Abstand zwischen Hornhaut und Glaskörper-Netzhaut-Grenze (im Folgenden als Achsenlänge bezeichnet) der Augen gemessen. Anschließend erfolgte die Befestigung der Linsen sowie die Saline- und Insulininjektionen (Versuchsgruppen siehe Tabelle 1). Die Linsen wurden lediglich einmal täglich zur Reinigung abgenommen. Die Injektionen wurden am dritten sowie letzten Versuchstag wiederholt. Ebenfalls am letzten Versuchstag wurde erneut die Refraktion, sowie die Länge der Kompartimente der Augen gemessen. Die Tiere wurden nach der Injektion am letzten Versuchstag durch Inhalation einer Ätherüberdosis getötet.

Tabelle 1: Übersicht der Linsenbehandlung und Injektionsart für die Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Injektionen intravenös (IV) oder intraperitoneal (IP)	Linse (+7 dpt oder -7 dpt)
„IV-normale Seherfahrung“	IV	beidseitig keine Linsen
„IP-normale Seherfahrung“	IP	beidseitig keine Linsen
„IV-Sammellinse“	IV	Sammellinse (monokular)
„IP-Sammellinse“	IP	Sammellinse (monokular)
„IV-Streulinse“	IV	Streulinse (monokular)
„IP-Streulinse“	IP	Streulinse (monokular)

Jede Versuchsgruppe bestand aus Saline- und Insulin-injizierten Tieren. Im Folgenden werden die Augen der Tiere, die mit einer Linse behandelt wurden als „linsenbehandelte Augen“ und die kontralateralen, nicht mit Linsen behandelten Augen als „unbehandelte Augen“ bezeichnet.

2.1.3 Linsen & Injektionen

Nach der Ultraschallmessung am ersten Versuchstag wurden die Tiere mit Diethyläther (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika) anästhesiert, um die Linsen anzubringen und Saline (0,9% - Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) oder Insulin (Insulin rapid 40 I.E./ml – Sanofi, Paris, Frankreich) zu injizieren.

Linsen

Die Linsen (Durchmesser 20 mm) wurde mit Hilfe eines Klettverschlussringes (Durchmesser: 20 mm, Ringbreite: 5 mm – Velcro, Manchester, NH, Vereinigte Staaten von Amerika) befestigt. Die „harte“ Seite des Klettverschlussringes war an der Linsenrückseite angeklebt. Das „weiche“ Gegenstück des Klettverschlussringes wurde mit Lösungsmittelfreiem Sekundenkleber (Sekunden Alleskleber Gel - UHU GmbH, Bühl, Deutschland) um das Auge des Huhns befestigt, sodass das Auge in der Mitte des Ringes positioniert war. Der Rand der Linse sowie die Seiten des Klettverschlusses wurden mit einem Streifen Leukosilk (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) umwickelt, damit die Linsen möglichst wenig verunreinigt wurden.

intravenöse Injektionen

Insulin oder Saline (Volumen: 25 µl, Konzentration: 1,4 mg/ml) wurde unverdünnt mit einer Insulin-Spritze (BD Micro-Fine +, U-40 Insulin - BD Medical, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika) in die Flügelvene injiziert. Die Injektionen wurden als erfolgreich gewertet, wenn eine Blutung nach Injektion zu sehen war. Die Blutung wurde durch Druck auf die Injektionsstelle unterbunden. Die Kanüle wurde zwischen den Injektionen desinfiziert (Ethanol, 70%ig) und nach dreimaligem Benutzen ausgetauscht. Alle Injektionen erfolgten unter Äthernarkose. Die Injektionen am letzten Versuchstag erfolgten zehn Minuten oder zwei Stunden vor der Tötung der Tiere.

intraperitoneale Injektionen

Die intraperitonealen Injektionen (Volumen: 250 µl, Konzentration: 0,28 mg/ml) erfolgen parallel zur Längsachse des Kükens mit einer 1 ml Spritze (Syringe 1 ml, BD Plastipak - BD Medical, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika) und 27G Kanüle (27G 3/4" – Nr. 20, 0,4 x 19 mm, BD Microlance 3 - BD Medical, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika). Die Injektionsstelle befand sich caudo-lateral des Brustkorbs. Alle Injektionen erfolgten unter Äthernarkose.

intravitreale Injektionen

Intravitreale Injektionen (Volumen: 12,5 µl; Konzentration: 0,28 mg/ml) erfolgten mit einer Insulinspritze (BD Micro-Fine +, U-40 Insulin - BD Medical, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika). Die Einstichstelle befand sich in der oberen, kaudalen Hälfte des Lids.

2.1.4 Refraktionsmessung

Die Refraktion wurde mit dem Verfahren der Infrarot-Photoskiaskopie (Schaeffel, Howland, & Farkas, 1986) gemessen. Die Messapparatur bestand aus einer Scheibe, auf der in der unteren, lichtundurchlässigen Hälfte Infrarot-Leuchtdioden in vier horizontalen Reihen angeordnet waren. Die obere Hälfte der Scheibe war lichtdurchlässig und beherbergte keine Infrarot-Leuchtdioden. Die Scheibe war vor dem Objektiv einer Infrarotlichtempfindlichen Kamera (Ci-20 PR, Canon, Tokia, Japan) befestigt, mit der das Auge gefilmt wurde. Das von den Leuchtdioden emmitierte Licht trat in das Auge ein und wurde vom Augenfundus reflektiert. Das reflektierte Licht konnte durch den lichtdurchlässigen Bereich der Scheibe in das Objektiv der Kamera eindringen (Abb. 9). In Abhängigkeit der Refraktion des Auges entstand dadurch ein Helligkeitsprofil in der Pupille, dessen Steilheit mit der Fehlsichtigkeit des Auges korrelierte. Die Position der Pupille und damit des Messbereiches wurde automatisch über die Position des Purkinjereflex bestimmt. Das runde Messfeld konnte manuell an die Größe der Pupille angepasst werden. Die Aufnahmen der Camera wurden an

einen Computer (Pentium Pro®, 128 MB RAM, Microsoft Windows 95) übertragen und auf einem Monitor dargestellt (Flex Scan F56 Color Display Monitor, 800x600px, 75Hz). Die Refraktion wurde von dem Programm chickref2006 (Prof. Dr. Frank Schaeffel, Sektion für Neurobiologie des Auges, Forschungsinstitut für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Tübingen) analysiert und ebenfalls auf dem Monitor dargestellt. Angenommen das zu messende Auge war emmetrop, so wurde der reflektierte Lichtkegel auf die Leuchtdioden fokussiert - es trat kein Licht durch den oberen Teil der Scheibe in das Kameraobjektiv ein - und die Pupille erschien schwarz. War das zu messende Auge myop, wurde der reflektierte Lichtkegel vor dem Kameraobjektiv fokussiert und lediglich aus der unteren Hälfte der Pupille reflektierte Strahlen konnten in das Kameraobjektiv eintreten, wodurch die untere Hälfte der Pupille heller erschien als die obere Hälfte. Im Gegensatz dazu war die Pupille eines hyperopen Auges in der oberen Hälfte heller als in der unteren Hälfte, da lediglich reflektierte Strahlen aus der oberen Hälfte der Pupille durch den lichtdurchlässigen Bereich der Scheibe in das Objektiv der Kamera eintreten konnten.

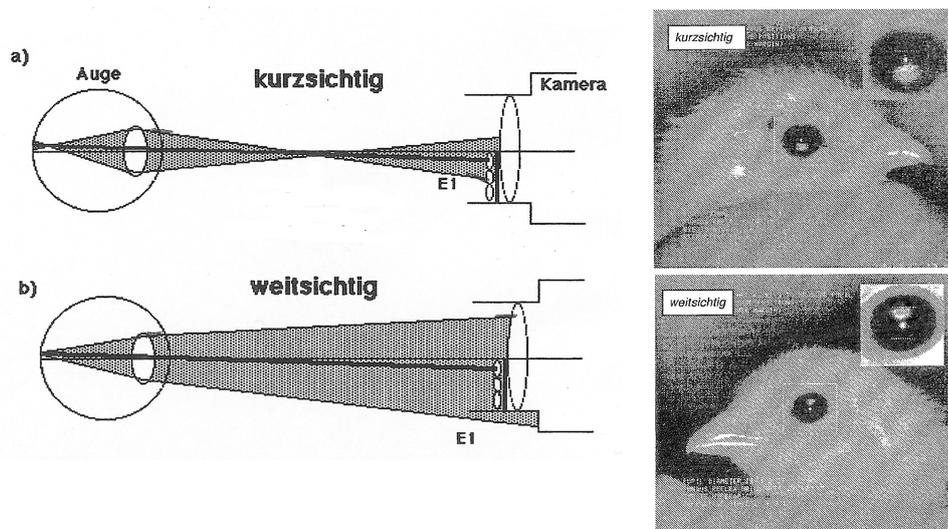


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Infrarot-Photoskiaskopie mit Strahlengang. a) Strahlengang im kurzsichtigen Auge b) Strahlengang im weitsichtigen Auge. (Quelle: Dissertation Marieluise Bartmann: Retinales Dopamin und Refraktionssteuerung beim Haushuhn. 1994, Frankfurt am Main)

Durch Vorhalten von Linsen verschiedener Stärke vor das Hühnerauge wurde vorab ein Umrechnungsfaktor bestimmt, mit dessen Hilfe die Geradensteigung in Refraktionsangaben umgewandelt wurde. Diese Eichung musste nur in größeren zeitlichen Abständen durchgeführt werden. Der Mittelwert von zehn in Reihe gemessenen Helligkeitsprofilen mit einer Abweichung von weniger als 0,25 D wurde auf dem Monitor, auf dem auch das von der Kamera aufgezeichnete Bild sichtbar war, dargestellt.

Die Messungen erfolgten in einem abgedunkelten Raum. Die Hühner wurden ca. einen Meter vor dem Kameraobjektiv positioniert, sodass die Leuchtdioden senkrecht und zentral in das der Kamera zugewandte Auge strahlten.

2.1.5 Messung der Längen der Kompartimente des Auges

Die Längen der Kompartimente des Auges wurden mit einem Ultraschallgerät (Echorule Ultrasonic Biometer - Vision Care Phakosystems Inc., Downsview, Canada) im Anschluss an die Refraktionsmessung bestimmt. Über den Ultraschallkopf wurde ein ca. 0.5 mm langer Gummischlauch gestülpt und mit Reinstwasser befüllt. Der Gummischlauchaufsatz wurde mit einem Überzug aus konvex geformten Parafilm (Parafilm „M“ 996 – Brand, Wertheim, Deutschland) abgeschlossen.

Vor Messbeginn wurde ein Tropfen Xylocain (2%ig – AstraZeneca, Wedel, Deutschland) auf die Kornea gegeben. Die Sonde wurde ebenfalls regelmäßig mit der Xylocainlösung benetzt. Der Ultraschallkopf wurde für die Messungen auf die Kornea aufgesetzt. Das auf dem Monitor des Ultraschallgerätes angezeigte Bild konnte mit Hilfe eines Fußpedals eingefroren werden. Aus dem Abstand der Peaks der Hornhaut, Linsenvorderseite, Linsenrückseite und Netzhaut (Abb. 10) wurde die Vorderkammertiefe (Linsenvorderseite-Hornhaut), die Linsendicke (Linsenrückseite-Linsenvorderseite), die Glaskörpertiefe (Netzhaut-Linsenrückseite) und Achsenlänge (Summe aus Vorderkammertiefe, Linsendicke und Glaskörpertiefe) berechnet. Pro Auge wurden mindestens drei Ultraschallbilder analysiert.

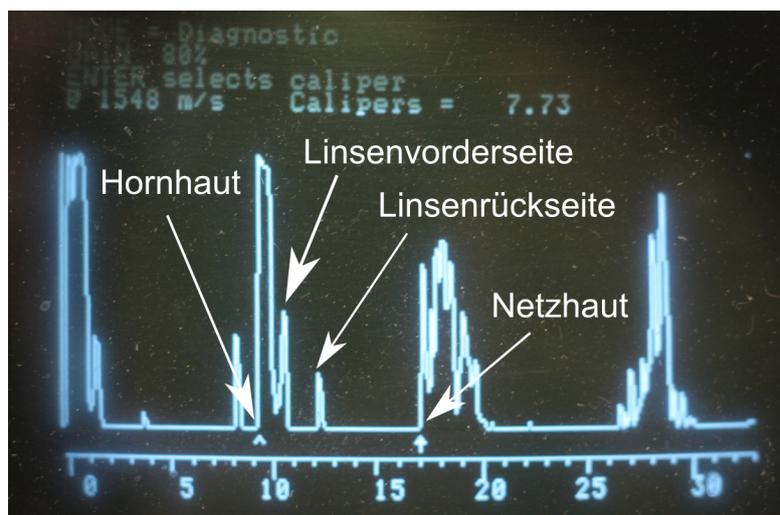


Abbildung 10: Abbildung auf Monitor des Ultraschallgerätes sowie Kennzeichnung der Peaks für die Hornhaut, Linsenvorderseite, Linsenrückseite und Netzhaut. Aus dem Abstand der Peaks zueinander konnten anschließend die Längen der Kompartimente der Augen berechnet werden.

Auswertung & Statistik

Da die Tiere unterschiedlich viele Versuchstage behandelt wurden, wurde die Refraktionsänderung sowie das Wachstum der Kompartimente der Augen zwischen erstem und letztem Versuchstag auf die Anzahl der Versuchstage normiert.

War die Linse eines Tieres in der Versuchswoche abgefallen wurde dieses Tier aus der Analyse ausgeschlossen. Für die Versuchsgruppen „IV-normale Seherfahrung“ und „IP-normale Seherfahrung“ wurden die Messwerte beider Augen zu einem Datenpunkt zusammengefasst. Ein Effekt der Insulininjektion wurde in diesen Behandlungsgruppen durch einen ungepaarten t-Test bzw. Wilcoxon rank sum Test ermittelt.

Um einen Effekt der Linsenbehandlung und/oder der Insulininjektion aufzuzeigen wurde in den Linsen behandelten Versuchsgruppen eine 2-way ANOVA durchgeführt, wenn die Daten normalverteilt waren und die gleiche Varianz aufwiesen. Waren die Daten nicht normalverteilt wurde eine Box-Cox-Transformation oder logarithmische Transformation durchgeführt. Waren die Daten nach der Transformation nicht normalverteilt wurde die ANOVA mit nicht normalverteilten Daten durchgeführt. Dies ist dies in den Ergebnissen angegeben. Als post hoc test diente der t-Test bzw. der Wilcoxon-Test, wobei ein Test für gepaarte Daten verwendet wurde, wenn der Effekt der Linse nachgewiesen werden sollte und ein Test für ungepaarte Daten zum Einsatz kam, wenn der Effekt der Insulininjektion verdeutlicht werden sollte.

Zu Versuchsbeginn lag kein signifikanter Unterschied in der Refraktion sowie der Längen der Kompartimente der Augen zwischen den Augen der Tiere einer Versuchsgruppe vor.

2.1.6 Präparation der Augen

Netzhaut und Aderhaut wurden am letzten Versuchstag präpariert, um sie nachfolgend im Insulin-ELISA und Western-Blot zu analysieren. Dazu wurden die Tiere mit Diethyläther (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika) getötet und anschließend dekapitiert. Die Präparation der Augen erfolgte fünf Minuten nach Dekapitierung. Dadurch wurde die Separation der einzelnen Schichten, vor allem der des retinalen Pigmentepithels von der Netzhaut, erleichtert. Das Auge wurde soweit wie möglich freigelegt indem das Lid mit einer Schere entfernt wurde. Anschließend wurde das Auge mit einer chirurgischen Pinzette aus der Augenhöhle gehoben und der Sehnerv mit einer Schere durchtrennt. Das Auge wurde parallel zur *Ora serrata* an der höchsten Stelle des Auges mit einer Rasierklinge in zwei Hälften geteilt. Aus der hinteren Augenhälfte wurde ein Stück des Gewebes bestehend aus Netzhaut, RPE, Aderhaut und Lederhaut mit einer Stanze (Biopsy Punch, 8 mm Durchmesser – Stiefel, Coral Gables, Florida, Vereinigte Staaten von Amerika) entfernt und die Gewebsschichten anschließend voneinander in Ringerinjektionslösung (B.Braun,

Melungen, Deutschland) getrennt. Dafür kamen unter anderem Filterpapiere (Nitrocellulose Membrane black, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sowie Schielhaken zum Einsatz. Aderhaut und Netzhaut wurden separat in Gefrier Röhrchen (CRYO.S, PP - Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -82°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Das Präparationsbesteck wurde nach den Präparationen für drei Stunden bei 180°C gebacken (Function line – Heraeus, Hanau, Deutschland).

2.1.7 Messung der Glukosekonzentration

Das bei der Dekapitierung hervortretende Blut wurde zur Bestimmung des Blutzuckerspiegels (Gerät: Accu-Chek Sensor – Roche, Basel, Schweiz; Stäbchen: Accu-Chek Sensor Comfort - Roche, Basel, Schweiz; Messbereich 10 - 600 mg/dl) verwendet. Für die Messung der Glukosekonzentration des Glaskörpers wurde dieser bei der Präparation des Auges mit einer Pinzette entnommen und auf einer Wachsplatte mit einer Rasierklinge zerkleinert. Die Glukosekonzentration des Glaskörpers wurde anschließend mit demselben Blutzuckermessgerät gemessen, mit dem auch die Glukosekonzentration im Blut bestimmt wurde.

Tiere, deren letzte intravenöse Injektion nicht erfolgreich war, wurden aus der Analyse der Glukosekonzentration in Glaskörper und Blut ausgeschlossen.

Statistik

Ob ein Effekt der Injektionsart auf die Glukosekonzentration im Glaskörper zehn Minuten nach Injektion in den Saline-injizierten Tieren vorlag wurde durch einen t-Test ermittelt. Der Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers zehn Minuten nach Injektion wurde durch einen weiteren t-Test verdeutlicht. Darüber hinaus wurde der Effekt von Insulin zwei Stunden nach Injektion mit dem Effekt von Insulin zehn Minuten nach Injektion durch einen t-Test analysiert.

Ob in den Linsenbehandelten Tieren ein Effekt der Insulininjektion und/oder der Linsenbehandlung vorlag wurde durch eine 2-way ANOVA analysiert. Als post hoc test diente der t-Test bzw. der Wilcoxon-Test, wobei ein Test für gepaarte Daten verwendet wurde, wenn der Effekt der Linse nachgewiesen werden sollte und ein Test für ungepaarte Daten zum Einsatz kam, wenn der Effekt der Insulininjektion verdeutlicht werden sollte.

2.1.8 Gewebepräparation

Lyse des Gewebes

Das präparierte Gewebe wurde zur weiteren Analyse mit dem Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, Vereinigte Staaten von Amerika) lysiert. Hierzu

wurden Stahlkugeln (stainless steel beads, Durchmesser: 5 mm – Quiagen, Venlo, Niederlande) in 2 ml Eppendorfgefäßen (Safe-lock Tubes 2,0 ml – Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf Eis vorgekühlt. Das Gewebe wurde in gefrorenem Zustand mit einem Schielhaken aus dem Gefrier Röhrchen in das 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 1x T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, ergänzt mit 1x PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Basel, Schweiz) und 1x cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) in das Eppendorfgefäß pipettiert (Netzhaut: 400 µl; Aderhaut: 300 µl; Glaskörper: 200 µl; ca. 20 ml/g Gewebe). Die Lysierung und Homogenisierung erfolgte für fünf Minuten bei 50 Hz und Raumtemperatur im Tissue Lyser LT (Quiagen, Venlo, Niederlande). Anschließend wurde das Homogenisat für fünf Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert (Biofuge stratos - Pierce Biotechnology, Rockford, IL, Vereinigte Staaten von Amerika). Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß bei 82°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet. Proben und Proteinkonzentration-Standards des Kits wurden mit dem Working Reagenz des Kits verdünnt (1:21). Anschließend wurden die Standards und Proben für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nachdem die Proben und Standards auf Raumtemperatur abgekühlt waren wurde die Absorption bei 562 nm Wellenlänge im Photometer (Ultrospec II - LKB Biochrom, Cambridge, Vereinigtes Königreich) gemessen. Aus den Absorptionswerten der Standards wurde eine Standardkurve berechnet. Diese und die Absorptionswerte der Proben dienen der Bestimmung der Gesamteproteinkonzentration. Die Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten als Doppelbestimmung.

2.2 Bestimmung der Insulinkonzentrationen in Netzhaut, Aderhaut und Glaskörper (Insulin-ELISA)

Testprinzip

Ein ELISA (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist ein quantitatives Nachweisverfahren, das auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an das Zielprotein und einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Das Zielprotein wird über Erstantikörper, welche in den wells einer Mikrotiterplatte anhaften, gebunden. Durch mehrere Waschschrirte werden ungebundene Proteine aus den wells entfernt. Anschließend wird ein weiterer Antikörper, an den ein Enzym gekoppelt ist, und der ebenfalls spezifisch an das Zielprotein bindet

(Detektionsantikörper), in die wells gegeben. Überschüssige Detektionsantikörper werden durch Waschschriffe entfernt. Anschließend wird ein Farbstoffsubstrat, das von dem Enzym des Detektionsantikörpers umgesetzt werden kann in die wells pipettiert. Anhand der Farbintensität der wells kann die Menge des Zielproteins quantifiziert werden.

Mit dem Insulin-ELISA sollte die Insulinkonzentration zehn Minuten nach intravenöser Injektion in der Aderhaut und Netzhaut und zehn Minuten nach intravitrealer Injektion im Glaskörper bestimmt werden.

Anwendung des Insulin-ELISAs

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration wurde das „Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit“ (Crystal Chem., Downers Grove, IL) verwendet. Die wells der Mikrotiterplatte waren bereits mit einem anti-Insulin Antikörper beschichtet. Die Insulinkonzentration jeder Probe erfolgte anhand von zwei Verdünnungen und Doppelbestimmungen. Die Proben wurden in die wells pipettiert und anschließend für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Das Gesamtvolumen pro well betrug 100 µl. Das Probenvolumen konnte abhängig davon wie viel Insulin voraussichtlich in den Proben vorhanden war, angepasst werden. Pro well wurde 100 µl Probe verwendet (Empfindlichkeitsbereich: 5 – 320 pg Insulin/ml). Die tatsächliche Proteinkonzentration musste bei einem größeren Probenvolumen als 5 µl angepasst werden (Formel 1).

$$C_p = C_s \times \frac{5}{V} \quad \text{Formel 1}$$

C_p : Insulinkonzentration der Probe

C_s : aus der Standardkurve berechnete Insulinkonzentration

V: Probenvolumen [µl]

Ungebundene Proteine wurden durch vier Waschschriffe mit je 300 µl Waschpuffer (1x) pro well entfernt. Anschließend wurden je 100 µl des Meerrettichperoxidase-konjugierten Anti-Insulin Antikörpers hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden ungebundene Antikörper durch sieben Waschschriffe mit je 300 µl Waschpuffer (1x) pro well entfernt. Dem Nachweis des Insulins diente das 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) Substrat, das von der Peroxidase umgesetzt werden konnte. 100 µl TMB wurde in jedes well gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe einer "Enzyme Reaction Stop" Lösung gestoppt und die Absorption in den wells bei 450 nm und einer Referenzabsorption von 630 nm Wellenlänge (Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Als Positivkontrolle diente Pankreasgewebe von unbehandelten Tieren.

Auswertung

Die Insulinkonzentration wurde auf die Proteinkonzentration des Gewebes normiert. Ob ein Effekt der Insulininjektion auf die Insulinkonzentration in der Netzhaut oder Aderhaut vorlag wurde durch ein t-Test, bzw. Wilcoxon rank sum Test ermittelt.

2.3 Bestimmung der Aktivität des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs in der Netzhaut (SDS-Page & Western Blot)

Wird der MAPK/ERK-Signalweg aktiviert wird die *extracellular-signal regulated kinase* (Abk. ERK) phosphoryliert. Demnach kann durch das Verhältnis von phosphoryliertem (pERK) zu nicht-phosphorylierten ERK (ERK) eine Aussage über die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs getroffen werden. Wird der PI3K-Signalweg aktiviert wird die Kinase Akt phosphoryliert. Auf die Aktivität dieses Signalwegs können Rückschlüsse durch das Verhältnis von phosphoryliertem Akt (pAkt) zu nicht phosphoryliertem Akt (Akt) gezogen werden. Mit Hilfe des Western-Blots sollte eine semiquantitative Analyse der Aktivität des PI3K- sowie MAP/ERK-Signalwegs durchgeführt werden, indem die Proteinmengen an pAkt, Akt, pERK sowie ERK sowie in der Netzhaut gemessen wurden. Zum Einsatz kamen Netzhäute der Tiere, denen zwei Stunden vor Präparation Insulin bzw. Saline IP-injiziert wurde. Da der für Akt eingesetzte Antikörper (Akt1 (2H10) Mouse mAb, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) Akt nicht mit der notwendigen Sensitivität detektiert wurde das Verhältnis von pAkt zu dem Heatshock Protein(Hsp)-90 analysiert, da dies das Protein eines Haushaltsgens ist, das sehr konstant in allen Zellen des Körpers exprimiert wird und daher als Referenz dienen kann.

Testprinzip

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Abk. SDS-Page) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld und wird vor dem Western-Blot durchgeführt. Dazu wird die Eigenladung des Proteins durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (Abk. SDS) überdeckt und die drei-dimensionale Struktur des Proteins durch Aufkochen aufgebrochen, sodass negativ geladene, linearisierte Proteine vorliegen. Diese wandern zuerst durch das Einwirken eines elektrischen Feldes in ein Sammelgel mit neutralem pH, in dem sie konzentriert werden, und anschließend in ein Trenngel mit basischem pH, in dem die eigentliche Auftrennung nach Größe und Ladung erfolgt. Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine in der SDS-Page werden die Proteine in einem elektrischen Feld von dem Trenngel auf eine Membran übertragen (engl. *blotting*). Die durch die SDS-Page erzeugten Proteinbanden bleiben während der Übertragung auf die

Membran erhalten. Der Transfer kann durch die Zugabe von Ponceau S, welches unspezifisch an Proteine bindet, bestätigt werden. Auf der Membran werden die Zielproteine durch die spezifische Bindung von Antikörpern (Primärantikörper & Immunkonjugat (bestehend aus Sekundärantikörper und Reporterenzym)) detektiert. Unspezifische Bindungsstellen werden blockiert und nicht gebundene Antikörper durch Waschschriffe entfernt. Die Detektion des Zielproteins erfolgt, indem ein Chemilumineszenzsubstrat durch das Reporterenzym umgesetzt wird. Die Intensität der Chemilumineszenz der Banden erlaubt eine semiquantitative Analyse der Zielproteinmenge.

Anwendung der SDS-Page und des Western Blots

Zur Detektion von pAkt, pERK, ERK sowie Hsp-90 wurde ein 3%iges Sammelgel und ein 8%iges Trenngel eingesetzt. Für das Gel wurde zunächst Wasser, 30% Bis/Acrylamide, 1,5 M Tris-HCl bzw. 0,5 M Tris-HCl und 1,0% SDS zusammen pipettiert (Hersteller aller folgenden Chemikalien und Angaben zu den verwendeten Lösungen siehe Tabelle 2-4). APS und TEMED wurden kurz vor dem Gießen des Gels hinzugefügt. Das Gel polymerisierte zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1 mm zueinander. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und polymerisierte innerhalb von 30 Minuten. Um eine glatte Oberkante des Trenngels zu erhalten wurde dieses mit Isopropanol bedeckt, welches nach der Polymerisation des Trenngels mit einem Whatmanpaper abgenommen wurde. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und mit einem Kamm (zehn Taschen) versehen. Auch das Sammelgel polymerisierte innerhalb von 30 Minuten. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Glasplatten mitsamt des enthaltenen Gels in die Kammer des Mini-PROTEAN Tetra System (Biorad, Hercules, CA, USA) eingespannt, in der das elektrische Feld zur Auftrennung der Proteine angelegt werden konnte. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (1x) befüllt. der Kamm wurde aus dem Gel entfernt, und die Taschen mit Laufpuffer ausgespült. Proben und Marker wurden 1:2 mit Laemmli Probenpuffer (2x) verdünnt, für vier Minuten bei 95°C im Wasserbad gekocht (Thermomixer comfort 1,5 ml – Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und anschließend sofort auf Eis gekühlt.

Jede Tasche wurde mit 20 µl einer mit Laemmli Probenpuffer verdünnten Probe, in denen 10 µg Protein enthalten waren, beladen. Eine der Taschen wurde mit eine Markerproteinmischung (Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, Bio Rad, Hercules, CA, USA) beladen, mit dessen Hilfe das Molekulgewicht der Banden bestimmt werden konnte. Eine Tasche wurde nicht beladen (Negativkontrolle) und eine dritte Tasche wurde mit einer Positivkontrolle beladen, die aus diversen Proben (Pankreas und Netzhaut) bestand. Bei allen durchgeführten Gelelektrophoresen wurde dieselbe Positivkontrolle verwendet.

Um die Proben und den Marker an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel zu konzentrieren wurde eine Spannung von 90 V für zehn Minuten angelegt, die anschließend auf 190 V für 60 Minuten erhöht wurde um die Proteine in Banden zu trennen. Nach der SDS-Page wurden die Glassplatten voneinander gelöst, das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel zehn Minuten in Transferpuffer (1x) gewaschen.

Zur Vorbereitung auf das Blotting der Proteine wurde eine Nitrocellulosemembran (Maße: 5,5 x 8,3 cm) für zehn Minuten in Transferpuffer gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt musste darauf geachtet werden, dass die Membran nicht austrocknete. Das Übertragen der Proteine von dem Gel auf die Trägermembran erfolgte in einem "Blotting Sandwich". Dieses bestand aus zwei Schwämmen, zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren (FP 30/0,2 CA-S Rotrand – Whatman, Maidstone, Vereinigtes Königreich) einer Nitrocellulosemembran und dem Gel. Das "Blotting Sandwich" wurde in der Kammer des Mini-PROTEAN Tetra Systems (Biorad, Hercules, CA, USA) so befestigt, dass es senkrecht zum elektrischen Feld ausgerichtet war. Dies resultierte darin, dass die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wanderten, welche sich auf der Anode zugewandten Seite der "Blotting Sandwiches" befand. Das Übertragen der Proteine erfolgte innerhalb von 50 Minuten bei 120 V in eisgekühltem Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran in Reinstwasser gewaschen. Das erfolgreiche Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde durch die Inkubation der Membran in einer 0,1% Ponceau S-Lösung bestätigt. Durch diese Färbung konnten einzelne Stellen markiert werden, in denen es, z. B. durch Lufteinlagerungen, nicht zu einer Proteinübertragung kommen konnte. Die Ponceau-Färbung wurde durch das Waschen in Reinstwasser und TBST rückgängig gemacht. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch die Inkubation in einer 3%igen BSA-Lösung über Nacht bei 4°C blockiert. Am nächsten Tag wurde die Membran auf Höhe der 50 kD Bande des Markers geschnitten, sodass aus einer Membran zwei Membranen resultierten. Die Membranen wurden mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 5) in 3% BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen vier Mal je vier Minuten in 1x TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation der Membranen im Immunkonjugat (siehe Tabelle 5) bestehend aus Sekundärantikörper und Meerrettichperoxidase erfolgte ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden vier Mal je vier Minuten in 1x TBST gewaschen, um ungebundene Immunkonjugate zu entfernen.

Die Detektion der Zielproteine erfolgte mit dem Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) durch die Zugabe von 2 ml Meerrettichperoxidase-Substrat pro Membran. Nach fünf Minuten Inkubationszeit, in der die Membranen nicht bewegt werden durften, wurden sie in einer Plastikhülle eingeschweißt und

die Chemilumineszenz gemessen (Camera: System Diana II – raytest; Program: Cerma Control for Camera System Diana II, raytest, Straubenhardt, Deutschland). Die Aufnahmezeiten betragen 1, 2, 3, 8, 15 und 30 Minuten. Anschließend wurden die entstandenen Abbildungen auf Überbelichtung mit dem Programm Advanced Image Data Analyser (AIDA, raytest) überprüft und mit Image J 1.47t (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

Auswertung & Statistik

Die Abbildungen des Western-Blots wurden nach der Methode von Kraus (Quelle: http://home.arcor.de/d-kraus/lab/ImageJ_Western_blots.html; gesehen am 10.08.2013) in Image J analysiert. Dafür wurde ein quadratischer Bereich des Blots markiert, der die zu analysierenden Banden umfasste. In diesem Auswahlbereich wurde die Helligkeit der vertikal übereinander liegenden Pixel durch Image J aufsummiert. Ein Diagramm wurde erstellt in dem die Helligkeit für alle vertikal über einander liegenden Pixel entlang der horizontalen Achse des Auswahlbereichs dargestellt war. Da die Helligkeit der Banden verschieden zum Hintergrund war entstand pro Bande ein *peak* in diesem Diagramm. Manuell wurde anschließend die Grundlinie eingezogen, die die Banden (die *peaks*) voneinander trennte. Die Fläche zwischen Grundlinie und *peaks* konnte angewählt werden und einen Wert, vermutlich die Pixelsumme des Bereichs, wurde für jede Bande ausgegeben. Diese Werte dienten als Maß für die Intensität der Bande.

Banden, in denen Luft einschüsse vorhanden waren wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Stärke der Banden wurde zuerst auf die Intensität der Banden der Positivkontrolle normiert (z.B. Bandenstärke pERK in Probe 1 normiert auf Bandenstärke pERK in der Positivkontrolle). Für die Aktivität des MAPK/ERK-Signalwegs wurde danach das Verhältnis der normierten Bandenintensität von pERK zu ERK berechnet. Für die Aktivität des PI3K-Signalwegs wurde das Verhältnis der normierten Bandenintensität von pAkt zu Hsp-90 berechnet.

Um einen Effekt der Insulininjektion und/oder Linsenbehandlung auf die Aktivität der Signalwege zu ermitteln wurde eine 2-way ANOVA durchgeführt. Waren die Daten selbst nach Transformation nicht normalverteilt, ist dies in den Ergebnissen angegeben. Als post hoc test diente der t-Test bzw. der Wilcoxon-Test, wobei ein Test für gepaarte Daten verwendet wurde, wenn der Effekt der Linse nachgewiesen werden sollte und ein Test für ungepaarte Daten zum Einsatz kam, wenn der Effekt der Insulininjektion verdeutlicht werden sollte.

Tabelle 2: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

	Trenngel 8% [ml]	Sammelgel 3% [ml]
Wasser	2,638	1,38
30% Bis/Acrylamide	1,675	0,2
1,5 M Tris pH = 8,8	1,563	-
0,5 M Tris pH = 6,8	-	0,25
1,0% SDS	0,0625	0,02
TEMED	$3,125 \times 10^{-3}$	0,002
1,2% APS	0,3125	0,15

Tabelle 3: Lösungen SDS-Page & Western-Blot

	Zusammensetzung
3% BSA	3% Bovine Serum Albumin in 1x TBST
2x Laemmli Proben Puffer	37,97% Wasser 13,37% 0,5M Tris-HCl, pH 6,8 26,74% Glycerol wasserfrei 21,39% 1% SDS 0.53% 2-Mercaptoethanol 0.31 mM Bromphenol Blau
1,0% SDS	1% SDS in Wasser
10x Transferpuffer	250 mM Trizma Base 2 M Glycine in Wasser
1x Transferpuffer	20% Methanol 10% 10x Transfer Buffer 70% Wasser
10x TBS pH = 7,6	200 mM Trizma Base 1,37 M NaCl in Wasser
1x TBST	10% 10x TBS 90% Wasser 0,1% Tween 20
1,5M Tris-HCl pH = 8,8	1.5 M Trizma Base in Wasser
0,5M Tris-HCl pH = 6,8	0.5 M Trizma Base in Wasser
0,1 % Ponceau S	0,1 % Ponceau S 99% Wasser 1% 100%ige Essigsäure
10x Laufpuffer	250 μ M Trizma Base 1,92 M Glycine 1% SDS ultra pure in Wasser

Tabelle 4: Chemikalien SDS-Page & Western-Blot

	Hersteller
1,2% Ammoniumpersulfat (APS; 228,18 g/mol)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
30% Bis/Acrylamide	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovine Serum Albumin (BSA; 66 g/mol)	ChemCruz, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA
Bromphenol Blau (691,94 g/mol)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glycine (75,07 g/mol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (#161-0375)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR Prolabo Chemicals, Radnor, PA, USA
Ponceau S (760,56 g/mol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure \geq 99% (288,38 g/mol)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED 99% p. a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Base (121,14 g/mol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 5: Antikörper & Immunkonjugate des Western-Blots

Antikörper	Bezeichnung	Konzentration in 3% BSA & TBST	Hersteller
Anti-pAkt	phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) rabbit mAb (#2965)	1:2000	Cell Signaling, Cambridge, Verinigtes Königreich
Anti-ERK	human/mouse/rat ERK1/ERK2 Antibody mAb (#MAB1576)	1:4000	RD Systems, Minneapo- lis, MN, USA
Anti-pERK	Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb, (#4370)	1:2000	Cell Signaling, Cam- bridge, Vereinigtes Königreich
Anti-Hsp-90	Heat Shock Protein 90mouse mAb, (#ABIN361792)	1:500	Antikoerper-online.de, Aachen, Deutschland
Immunkonjugate	Goat Anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate, (#401253)	1:20000	Calbiochem, San Diego, CA, USA
	Rabbit Anti-Goat IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate, (#401515)	1:10000	Calbiochem, San Diego, CA, USA
	Goat Anti-Rabbit IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate, (#401315)	1:20000	Calbiochem, San Diego, CA, USA

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Emmetropisierung des unbehandelten Auges und auf die Emmetropisierung mit hyperopem oder myopem Defokus

Um den Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Emmetropisierung in Tieren mit normaler Seherfahrung und in Tieren, in denen experimentell Weitsichtigkeit (durch Vorsetzen von +7 D Sammellinsen) oder Kurzsichtigkeit (durch Vorsetzen von -7 D Streulinsen) induziert wurde, zu untersuchen, wurde zu Versuchsbeginn die Refraktion, sowie die Längen der Kompartimente des Auges (Vorderkammertiefe, Linsendicke, Glaskörpertiefe, Achsenlänge) gemessen. Anschließend wurde bei den Tieren der Versuchsgruppen, die mit Linsen behandelt wurden, einseitig eine Linse vor dem Auge befestigt und allen Tieren Insulin oder Saline intraperitoneal (IP) oder intravenös (IV) injiziert. Die Injektionen wurden am dritten, sowie letzten Versuchstag wiederholt. Ebenfalls am letzten Versuchstag erfolgte erneut die Messung der Refraktion sowie der Längen der Kompartimente der Augen. Die Refraktionsänderung zwischen dem letzten und ersten Versuchstag sowie das Wachstum der Kompartimente der Augen sind auf die Anzahl der Behandlungstage (drei bis sieben Tage) normiert und in den folgenden Diagrammen dargestellt. Die Refraktion und die Längen der Kompartimente der Augen zu Versuchsende, die Behandlungsdauer sowie die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

3.1.1 Der Effekt von Insulin auf die Refraktionsentwicklung

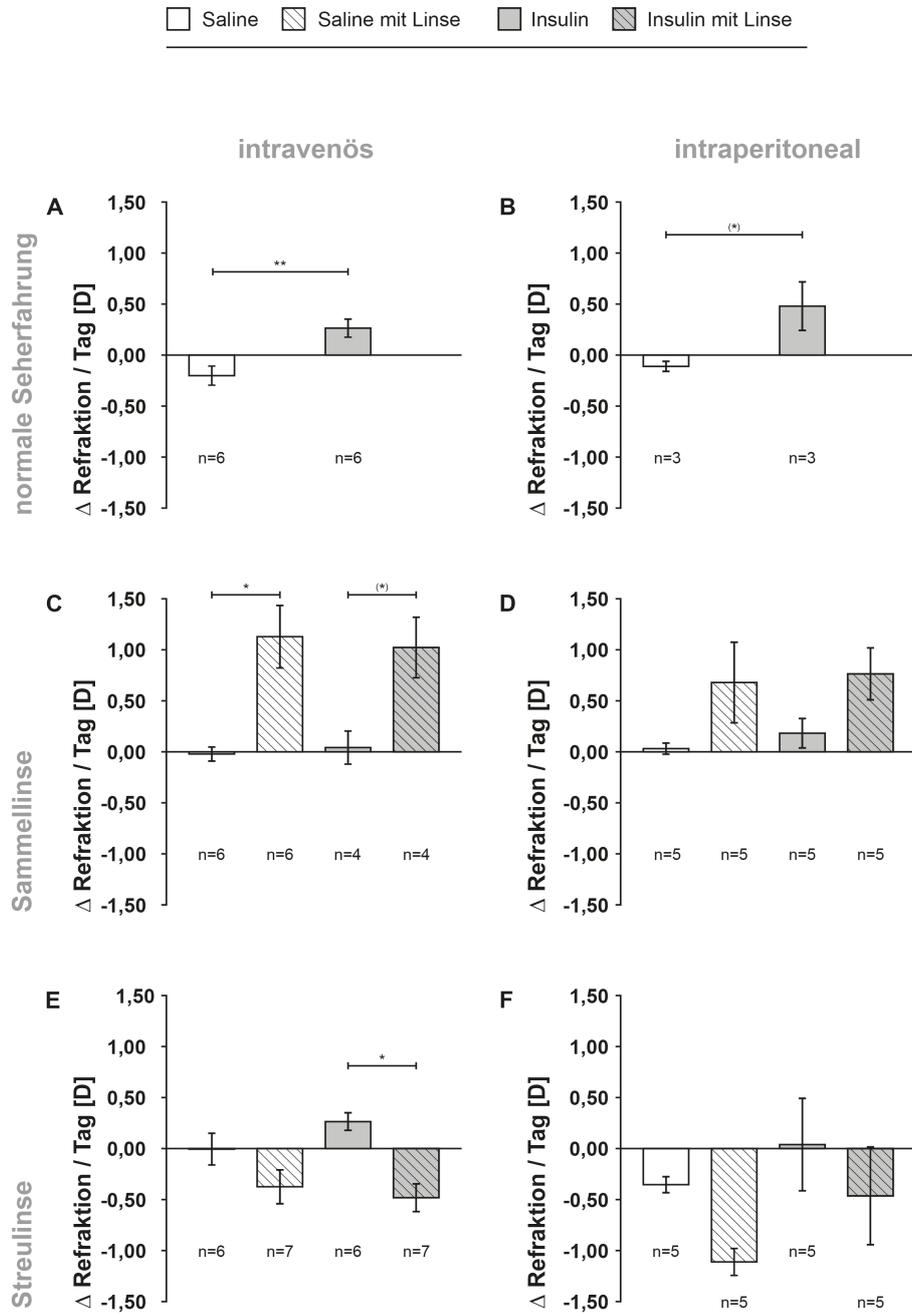


Abbildung 11: Darstellung der auf die Versuchstage normierte Refraktionsänderung zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen: (A) IV-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (B) IP-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (C) monokular mit einer Sammellinse behandelte IV-injizierte Tiere; (D) monokular mit einer Sammellinse behandelte IP-injizierte Tiere; (E) monokular mit einer Streulinse behandelte, IV-injizierte Tiere; (F) monokular mit einer Streulinse behandelte, IP-injizierte Tiere. Intravitreale Insulininjektionen hatten einen signifikanten Effekt auf die Refraktionsänderung der nicht mit Linsen behandelten Tiere und führten zu hyperopen Refraktionsänderungen. In den IV-injizierten Tieren bewirkten Sammellinsen eine hyperope Refraktionsänderung, sowohl in den Insulin- als auch in den Saline-injizierten Tieren. Streulinsen führten zu signifikanten myopen Refraktionsänderungen in den Insulin-injizierten Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0,05; **P < 0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

mit normaler Seherfahrung

nach intravenösen Injektionen

Intravenöse Insulininjektionen hatten einen signifikanten Effekt auf die Refraktionsänderung der Tiere mit normaler Seherfahrung (t-Test, $t = -3,61$, $df = 10$, $P = 0,005$). Die Refraktion der Saline-injizierten Tiere betrug zu Beginn des Versuchs $+2,12 \pm 0,3$ D, die der Insulin-injizierten Tiere $+2,07 \pm 0,51$ D. Die Refraktion der Tiere, denen Saline intravenös injiziert wurde, nahm ab, während sie durch Insulininjektionen zunahm (Abb. 11A).

nach intraperitonealen Injektionen

Ähnliche Refraktionsänderungen waren in den IP-injizierten Tieren sichtbar: während die Refraktion bei den Saline-injizierten Tieren über die Behandlungsdauer abnahm (Refraktion zu Beginn: $+2,05 \pm 0,59$ D), waren die Tiere nach intraperitonealen Insulin-Injektionen weitsichtiger als zu Beginn des Versuchs (Refraktion zu Beginn: $+1,78 \pm 0,07$ D) Abb. 11B). Jedoch war die Refraktionsänderung, anders als bei den IV-injizierten Tieren, nicht signifikant verschieden (t-Test, $P = 0,072$).

mit myopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

In den IV-injizierten Tieren hatte die Sammellinse einen signifikanten Effekt auf die Refraktionsentwicklung (2-way ANOVA, Tabelle 6). Die Saline injizierten Tiere kompensierten die vorgesetzten Linsen und wurden weitsichtig (Refraktion zu Beginn $+1,74 \pm 0,43$ D), während sich die Refraktion in den kontralateralen, unbehandelten Augen kaum änderte (Refraktion zu Beginn: $+2,23 \pm 0,29$ D; gepaarter t-Test, $t = 3,69$, $df = 5$, $P = 0,014$; Abb. 11C). In den Insulin-injizierten Tieren wurde ein ähnlicher Effekt der Sammellinse auf die Refraktionsänderung gemessen: ebenfalls wurden die Linsen-behandelten Augen hyperoper (Refraktion zu Beginn: $+1,30 \pm 0,17$ D), während die unbehandelten Augen eine sehr geringe Refraktionsänderung zeigen (Refraktion zu Beginn: $+1,68 \pm 0,58$ D). Der Unterschied der Refraktionsänderung in den Insulin-injizierten Tieren war jedoch nicht signifikant (gepaarter t-Test, $P = 0,08$).

Es konnte kein Effekt der Insulininjektion auf die Refraktionsänderung festgestellt werden (2-way ANOVA, Tabelle 6). Die Stärke der Refraktionsänderung in den unbehandelten Augen sowie linsenbehandelten Augen war, unabhängig von der Injektionssubstanz, im Mittel sehr ähnlich.

Tabelle 6: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,01	0,01	0,93
Linse	1	5,86	22,79	< 0,001

nach intraperitonealen Injektionen

Auch in den IP-injizierten Tieren hatte die Sammellinsen-Behandlung einen signifikanten Effekt auf die Refraktionsänderung (2-way ANOVA, Tabelle 7). Die nachfolgenden gepaarten t-Tests konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied der Refraktionsänderung zwischen den linsenbehandelten Augen und den kontralateralen unbehandelten Augen sowohl der Saline-, als auch der Insulin-injizierten Tiere bestätigen (gepaarter t-Test, Saline: P = 0,169; Insulin: P = 0,20, Abb. 11D), obwohl die Sammellinsen-behandelten Augen im Mittel pro Tag stärker hyperop wurden, als die unbehandelten Augen.

Wie auch in den IV-injizierten Tieren hatten die Insulin-Injektionen keinen Effekt auf die Refraktionsänderung (2-way ANOVA, Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,07	0,24	0,63
Linse	1	1,88	6,57	0,020

mit hyperopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Die Streulinsen bewirkten in den Insulin-injizierten Tieren eine signifikante Abnahme der Refraktion (Refraktion zu Beginn: $+1,06 \pm 0,39$ D), während die unbehandelten Augen im Mittel eine Zunahme der Refraktion zeigten (Refraktion zu Beginn: $+1,69 \pm 0,26$ D; gepaarter t-Test, $t = -3,73$, $df = 5$, $P = 0,01$; Abb. 11E). In den Saline-injizierten Tieren hatten die Linsen keinen signifikanten Effekt auf die Refraktionsentwicklung (Refraktion zu Beginn, Linsenbe-

handeltes Auge: $+2,52 \pm 0,54$ D, unbehandeltes Auge: $+2,36 \pm 0,44$ D; gepaarter t-Test, $P = 0,20$).

Die Insulininjektionen hatten keinen signifikanten Effekt auf die Refraktionsänderung in dieser Versuchsgruppe (2-way ANOVA, Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Refraktionsentwicklung der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,018	0,14	0,71
Linse	1	1,83	14,75	0,001

nach intraperitonealen Injektionen

Wie auch in den IV-injizierten Tieren konnte kein Effekt der Insulininjektionen auf die Refraktionsänderung der IP-injizierten Tiere bestätigt werden, die monokular eine Streulinse trugen (2-way ANOVA, Tabelle 9). Auch ein Effekt der Linse auf die Refraktionsänderung konnte, anders als in den IV-injizierten Tieren, nicht festgestellt werden (2-way ANOVA, Tabelle 9). Die mit Streulinsen behandelten Augen der Saline-injizierten Tiere zeigten die stärkste Refraktionsabnahme (Refraktion zu Beginn: $+4,67 \pm 0,5$ D), gefolgt von den linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere (Refraktion zu Beginn: $+3,5 \pm 0,29$ D) und den unbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere (Refraktion zu Beginn: $+4,54 \pm 0,19$ D; Abb. 11F). Die Refraktionsänderung der unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere war am geringsten (Refraktion zu Beginn: $+3,75 \pm 0,7$ D).

Tabelle 9: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	1,36	2,49	0,13
Linse	1	1,99	3,65	0,073

3.1.2 Der Effekt von Insulin auf die Achsenlänge

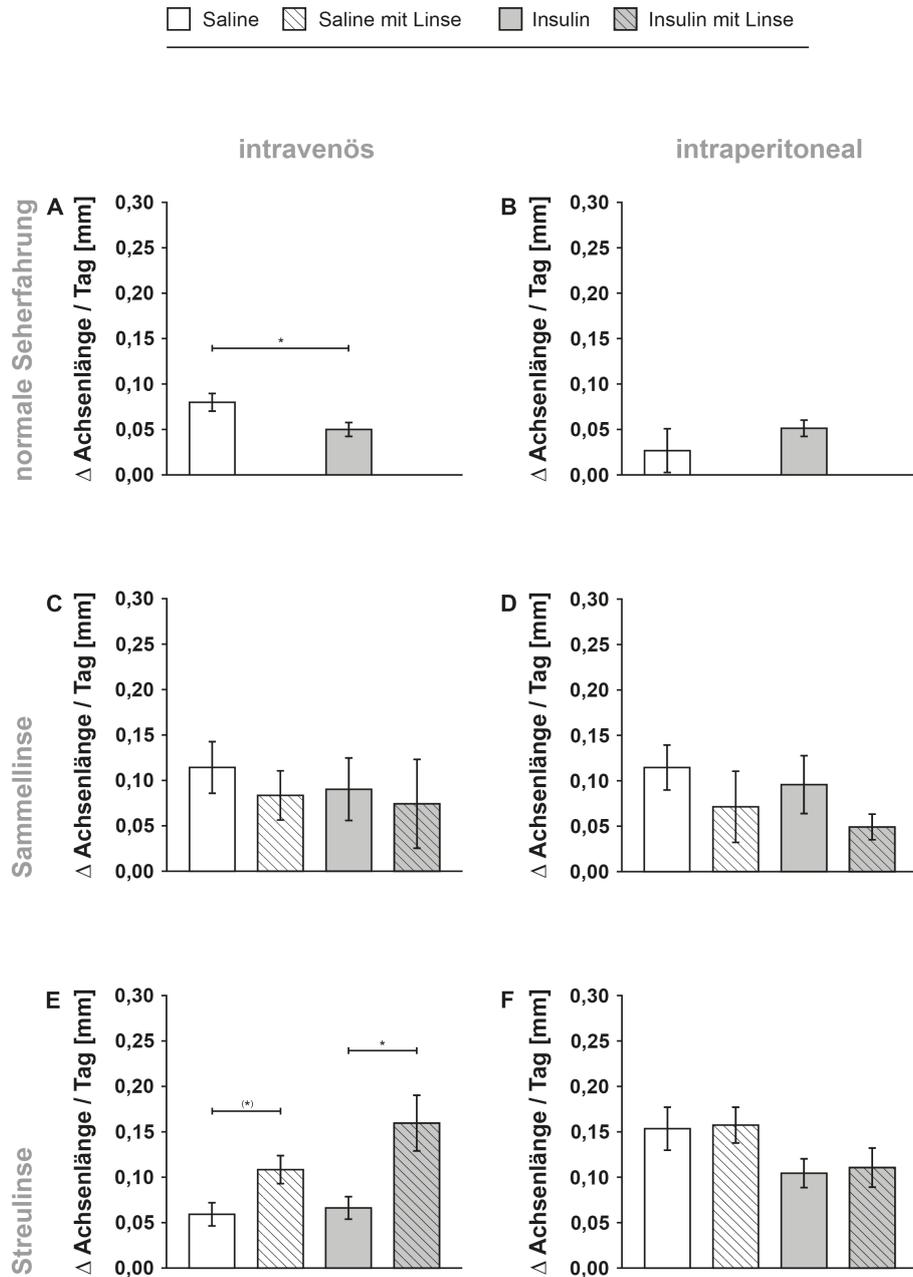


Abbildung 12: Darstellung der auf die Versuchstage normierten Änderung der Achsenlänge zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen: (A) IV-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (B) IP-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (C) monokular mit einer Sammellinse behandelte IV-injizierte Tiere; (D) monokular mit einer Sammellinse behandelte IP-injizierte Tiere; (E) monokular mit einer Streulinse behandelte, IV-injizierte Tiere; (F) monokular mit einer Streulinse behandelte, IP-injizierte Tiere. Insulininjektionen hatten eine geringere Zunahme der Achsenlänge in den IV-injizierten Tieren zur Folge, die bilateral keine Linsen trugen. In den IV-injizierten Tieren verstärkte die Streulinsebehandlung die Zunahme der Achsenlänge sowohl in den Insulin- als auch in den Saline-injizierten Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0,05; **P < 0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. n siehe Abb. 11

mit normaler Seherfahrung

nach intravenösen Injektionen

Insulininjektionen gingen in den IV-injizierten Tieren mit normaler Seherfahrung mit einer signifikant geringeren Zunahme der Achsenlänge einher (t-Test, $t = 2,42$, $df = 10$, $P = 0,036$). Die Achsenlänge der Saline-injizierten Tiere nahm ca. 0.025 mm pro Tag mehr zu, als die der Insulin-injizierten Tiere (Abb. 12A).

Eine signifikante Korrelation zwischen der Änderung Achsenlänge und der Refraktionsänderung pro Tag war jedoch nicht vorhanden („IV-normale Seherfahrung“: Salineinjektionen: $r = 0,110$; Insulininjektionen: $r = 0,139$).

nach intraperitonealen Injektionen

Anders als bei den IV-injizierten Tieren mit normaler Seherfahrung, hatten die Insulininjektionen keinen signifikanten Effekt auf die Änderung der Achsenlänge der IP-injizierten Tiere (t-Test, $P = 0,072$). Jedoch nahm die Achsenlänge der Insulin-IP-injizierten Tiere im Mittel stärker zu, als die der Saline-injizierten Tiere (Abb. 12B).

Auch in diesen Tieren konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Änderung der Achsenlänge und der Refraktionsänderung pro Tag festgestellt werden („IP-normale Seherfahrung“: Salineinjektionen: $r = 0,351$; Insulininjektionen: $r = 0,389$).

mit myopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Eine 2-way ANOVA konnte weder einen Effekt der Linsenbehandlung, noch der Insulininjektionen auf die Änderung der Achsenlänge der IV-injizierten Tiere, die monokular eine Sammellinse trugen, nachweisen (Tabelle 10). Im Mittel nahm die Achsenlänge der unbehandelten Augen der Saline-injizierten Tieren pro Tag am stärksten zu, gefolgt von den unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere und den linsenbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere (Abb. 12C). Am geringsten fiel die Zunahme der Achsenlänge der linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere aus.

Tabelle 10: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,001	0,24	0,63
Linse	1	0,003	0,59	0,45

nach intraperitonealen Injektionen

Auch in den Tieren, denen Saline- bzw. Insulin-IP injiziert wurde und die monokular eine Sammellinse trugen, war weder ein Effekt der Linse, noch der Insulininjektion auf die Zunahme der Achsenlänge nachzuweisen (2-way ANOVA, Tabelle 11). Wie auch bei in IV-injizierten Tieren nahm die Achsenlänge der unbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere pro Tag am stärksten zu, gefolgt von den unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere, den linsenbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere und zuletzt den linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere (Abb. 12D).

Tabelle 11: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,23	0,29	0,60
Linse	1	0,28	2,86	0,11

mit hyperopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Die Streulinsenbehandlung bewirkte eine signifikante Zunahme der Achsenlänge in den IV-injizierten Tieren (2-way ANOVA, Tabelle 12). Ein gepaarter t-Test zeigte ein signifikant stärkeres Achsenlängenwachstum in den linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere, im Vergleich zu den kontralateralen unbehandelten Augen (gepaarter t-Test, $t = 2,86$, $df = 5$, $P = 0,036$; Abb. 12E). Ein ähnlicher, wenn auch nicht signifikanter, Unterschied wurde in der Änderung der Achsenlänge der Saline-injizierten Tiere gemessen (gepaarter t-Test, $P = 0,093$).

Die Insulininjektionen hatten keinen Effekt auf die Änderung der Achsenlänge pro Tag (2-way ANOVA, Tabelle 12). Die Achsenlänge der unbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere nahm im Mittel gleich stark wie die der unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere zu. In den linsenbehandelten Augen nahm die Achsenlänge der Insulin-injizierten Tiere pro Tag ca. 0,05 mm mehr zu als die der Saline-injizierten Tiere.

Tabelle 12: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,004	1,49	0,24
Linse	1	0,038	14,18	0,001

nach intraperitonealen Injektionen

Die Streulinsenbehandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die Zunahme der Achsenlänge der IP-injizierten Tiere (2-way ANOVA, Tabelle 8). Stattdessen hatte Insulin einen Effekt auf die Zunahme der Achsenlänge (2-way ANOVA, Tabelle 13). Dieser Effekt konnte jedoch nicht durch nachfolgende t-Tests bestätigt werden (unbehandelte Augen: t-Test, $P = 0,091$; mit Linsen behandelte Augen: t-Test, $P = 0,184$). Im Mittel nahm die Achsenlänge der Saline-injizierten Tiere stärker zu als die der Insulin-injizierten Tiere, wobei kein Unterschied zwischen den linsenbehandelten und unbehandelten Augen vorhanden war (Abb. 12F).

Tabelle 13: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,012	5,88	0,027
Linse	1	< 0,001	0,059	0,81

3.1.3 Der Effekt von Insulin auf die Vorderkammertiefe

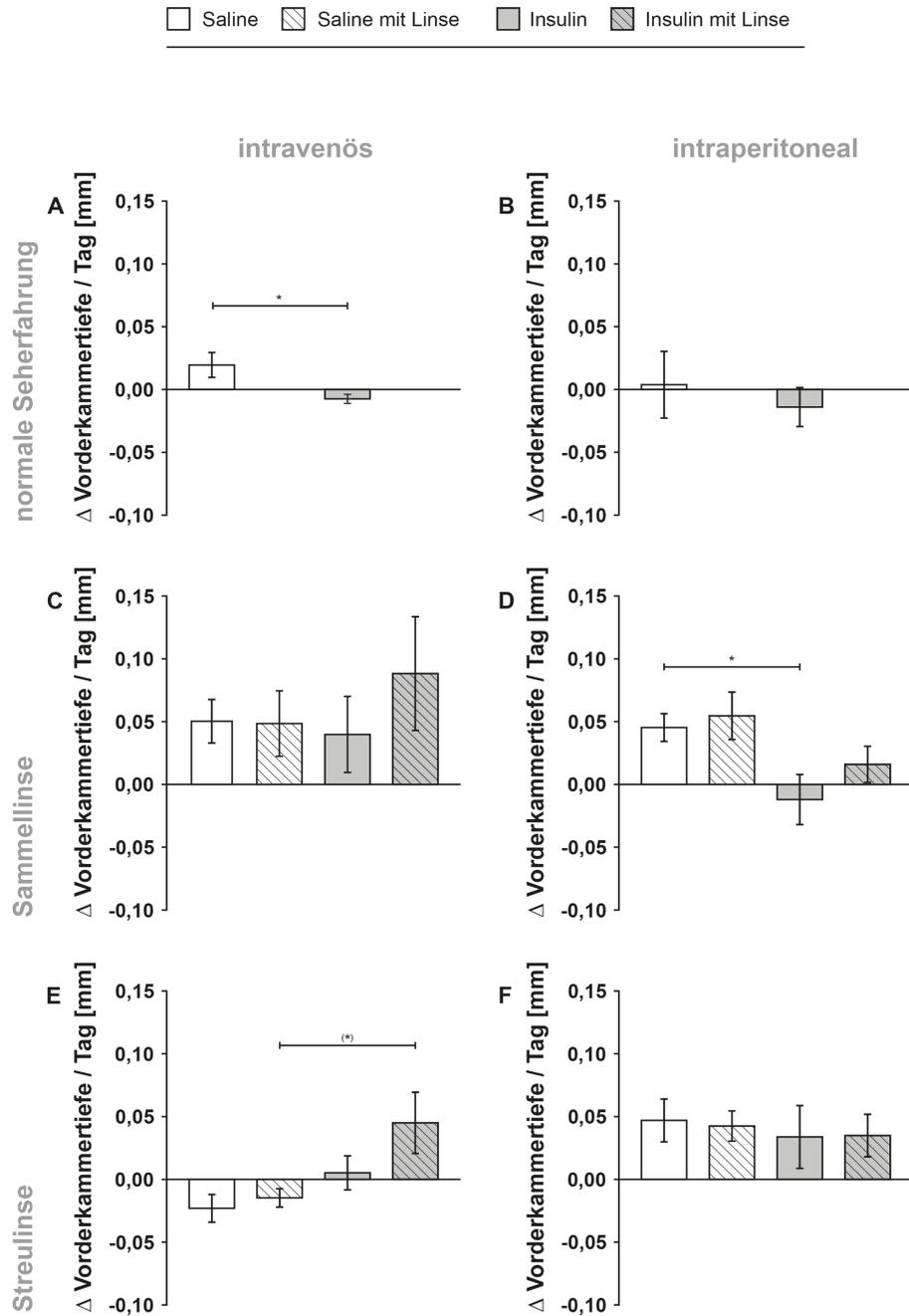


Abbildung 13: Darstellung des auf die Versuchstage normierten Wachstums der Vorderkammer zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen: (A) IV-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (B) IP-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (C) monokular mit einer Sammellinse behandelte IV-injizierte Tiere; (D) monokular mit einer Sammellinse behandelte IP-injizierte Tiere; (E) monokular mit einer Streulinse behandelte, IV-injizierte Tiere; (F) monokular mit einer Streulinse behandelte, IP-injizierte Tiere. Insulininjektionen resultierten in einem verlangsamten Wachstum der Vorderkammer in den IV-injizierten Tieren, die bilateral keine Linsen trugen und in den nicht mit Linsen behandelten Augen der Insulin-IP-injizierten Tiere, die auf dem kontralateralen Auge eine Sammellinse trugen. In den IV-injizierten Tieren die mit einer Streulinse behandelt wurden hatte Insulin einen wachstumsfördernden Effekt auf die Vorderkammer. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0,05; **P < 0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. n siehe Abb. 11

mit normaler Seherfahrung

nach intravenösen Injektionen

Insulin hatte einen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Vorderkammertiefe der IV-injizierten Tiere mit normaler Seherfahrung (t-Test, $t = 2,57$, $df = 6,31$, $P = 0,041$): Insulininjektionen resultierten in einer Abnahme der Vorderkammertiefe, während die Vorderkammer der Saline-injizierten Tieren zunahm (Abb. 13A).

nach intraperitonealen Injektionen

Anders als in den IV-injizierten Tieren hatte Insulin in den IP-injizierten Tieren, die ebenfalls keine Linsen trugen, keinen Effekt auf das Wachstum der Vorderkammer (t-Test, $P = 0,596$). Jedoch wuchs die Vorderkammer der Insulin-injizierten Tiere im Mittel ebenfalls geringer als die der Saline-injizierten Tiere (Abb. 13B).

mit myopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Es wurde weder ein Effekt der Sammellinse, noch der Insulininjektion auf das Wachstum der Vorderkammer in den IV-injizierten Tieren festgestellt (2-way ANOVA, Tabelle 14). In allen Behandlungsgruppen nahm die Vorderkammertiefe pro Tag zu (Abb. 13C).

Tabelle 14: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,001	0,261	0,616
Linse	1	0,002	0,424	0,524

nach intraperitonealen Injektionen

Insulin hatte einen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Vorderkammer in den IP-injizierten Tieren die monokular eine Sammellinse trugen (2-way ANOVA, Tabelle 15). Ein t-Test bestätigte ein signifikant geringeres Wachstum der Vorderkammer in den unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere im Vergleich zu den Saline-injizierten Tieren (t-Test, $t = 2,50$, $df = 8$, $P = 0,037$, Abb. 13D). Auch in linsenbehandelten Augen war die Zunahme der Vorderkammer der Saline-injizierten Tiere im Mittel stärker als die der Insulin-injizierten Tiere. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (t-Test, $P = 0,14$).

Tabelle 15 Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,011	8,791	0,009
Linse	1	0,002	1,331	0,27

mit hyperopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Das Wachstum der Vorderkammer wurde signifikant von der Insulininjektion in den IV-injizierten Tieren beeinflusst, die monokular eine Streulinse trugen (2-way ANOVA, Tabelle 16). Ein anschließender t-Test bestätigte den Trend, dass die Vorderkammer der linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere stärker als die der Saline-injizierten Tiere wuchs (t-Test, $P = 0,052$; Abb. 13E). In den unbehandelten Augen war kein Effekt der Insulininjektion nachweisbar (t-Test, $P = 0,258$), jedoch war erneut die Vorderkammer der Insulin-injizierten Tiere im Mittel pro Tag stärker gewachsen als die der Saline-injizierten Tiere.

Tabelle 16 Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,010	6,00	0,023
Linse	1	0,005	3,23	0,086

nach intraperitonealen Injektionen

Es konnte weder ein Effekt der Streulinse, noch der Insulininjektionen auf das Wachstum der Vorderkammer der IP-injizierten Tiere nachgewiesen werden (2-way ANOVA, Tabelle 17). Das Wachstum der Vorderkammer dieser Tiere war sehr ähnlich und belief sich auf ca. 0,04 mm pro Tag (Abb. 13F).

Tabelle 17: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,001	0,35	0,56
Linse	1	< 0,001	0,009	0,93

3.1.4 Der Effekt von Insulin auf die Linsendicke

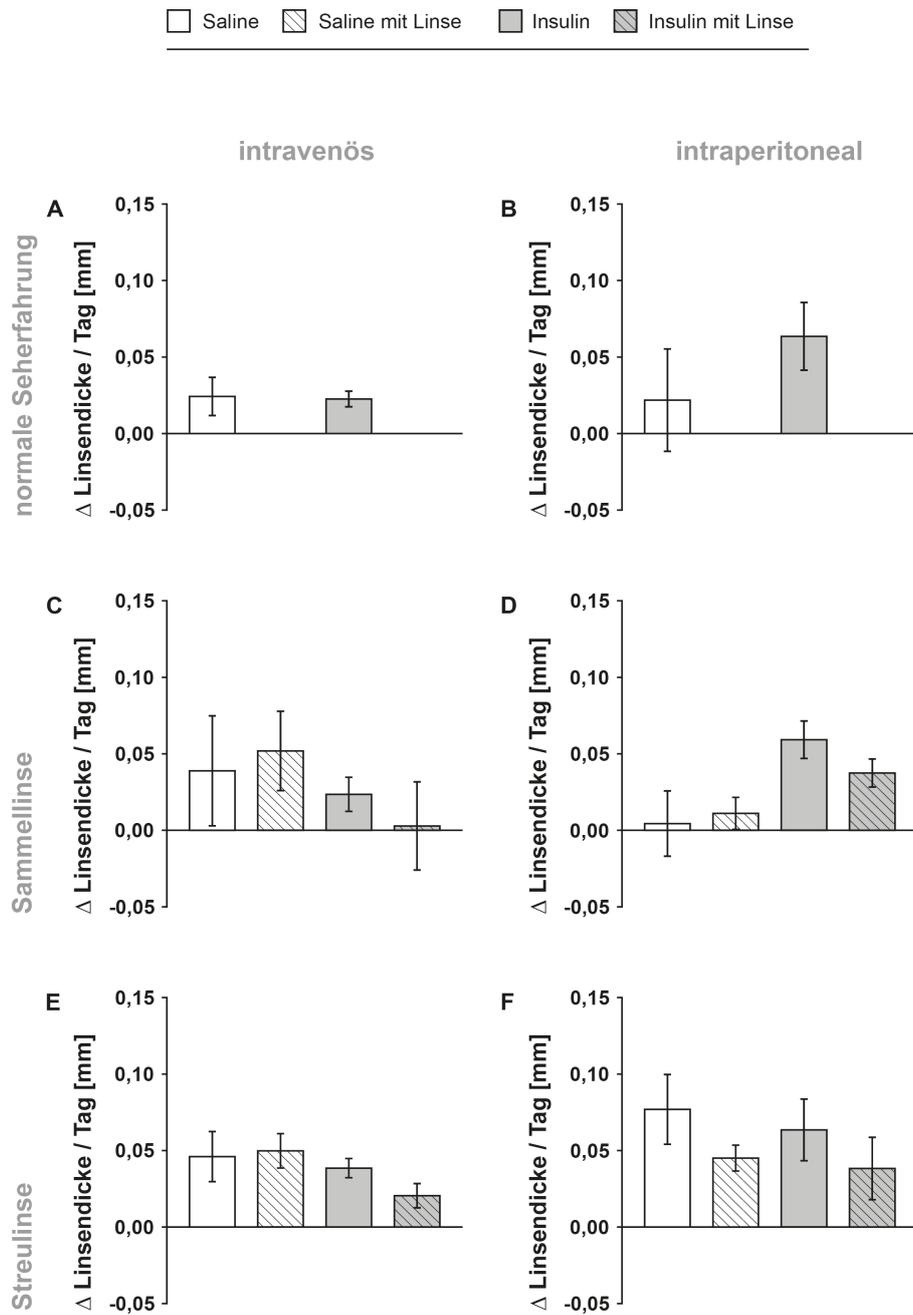


Abbildung 14: Darstellung der auf die Versuchstage normierten Zunahme der Linsendicke zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen: (A) IV-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (B) IP-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (C) monokular mit einer Sammellinse behandelte IV-injizierte Tiere; (D) monokular mit einer Sammellinse behandelte IP-injizierte Tiere; (E) monokular mit einer Streulinse behandelte, IV-injizierte Tiere; (F) monokular mit einer Streulinse behandelte, IP-injizierte Tiere. Weder Linsenbehandlungen noch Insulininjektionen hatten einen Effekt auf die Zunahme der Linsendicke. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0.05; **P < 0.01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. n siehe Abb. 11

mit normaler Seherfahrung

nach intravenösen und intraperitonealen Injektionen

Insulininjektionen hatten weder einen signifikanten Effekt auf die Zunahme der Linsendicke in den IV- noch in den IP-injizierten Tiere mit normaler Seherfahrung (IV-injizierte Tiere: Wilcoxon rank sum, $P = 0,38$; IP injizierte Tiere: t-Test, $P = 0,36$). Die Linsendicke beider Versuchsgruppen der IV-injizierten Tiere nahm im Mittel etwa 0,025 mm pro Tag zu (Abb. 14A). In den IP-injizierten Tieren nahm die Linsendicke in den Insulin-injizierten Tieren im Mittel 0,04 mm pro Tag mehr zu als in den Saline-injizierten Tieren (Abb. 14B).

mit myopem Defokus

nach intravenösen und intraperitonealen Injektionen

Weder ein Effekt der Sammellinse, noch der Insulininjektionen wurde in den Tieren nachgewiesen denen Insulin bzw. Saline IV bzw. IP injiziert wurde (2-way ANOVA, Tabelle 18 und 19). Im Mittel nahm die Linsendicke der Insulin-injizierten Tiere in den IP injizierten Tieren stärker und in den IV-injizierten Tieren geringer zu als die der Saline-injizierten Tiere (Abb. 14C, 14D).

Tabelle 18: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,005	1,18	0,29
Linse	1	0,001	< 0,001	0,98

Tabelle 19: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,002	4,026	0,061
Linse	1	0,002	3,536	0,077

mit hyperopem Defokus

nach intravenösen und intraperitonealen Injektionen

Weder ein Effekt der Streulinse noch der Insulininjektionen konnte auf die Zunahme der Linsendicke in den IV- und IP-injizierten Tieren nachgewiesen werden (2-way ANOVA, Tabelle 20, 21). In allen Behandlungsgruppen erfolgte eine Zunahme der Linsendicke (Abb. 14E, 14F).

Tabelle 20: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,002	2,35	0,14
Linse	1	0,006	0,80	0,38

Tabelle 21: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,001	0,31	0,58
Linse	1	0,004	2,40	0,14

3.1.5 Der Effekt von Insulin auf die Glaskörpertiefe

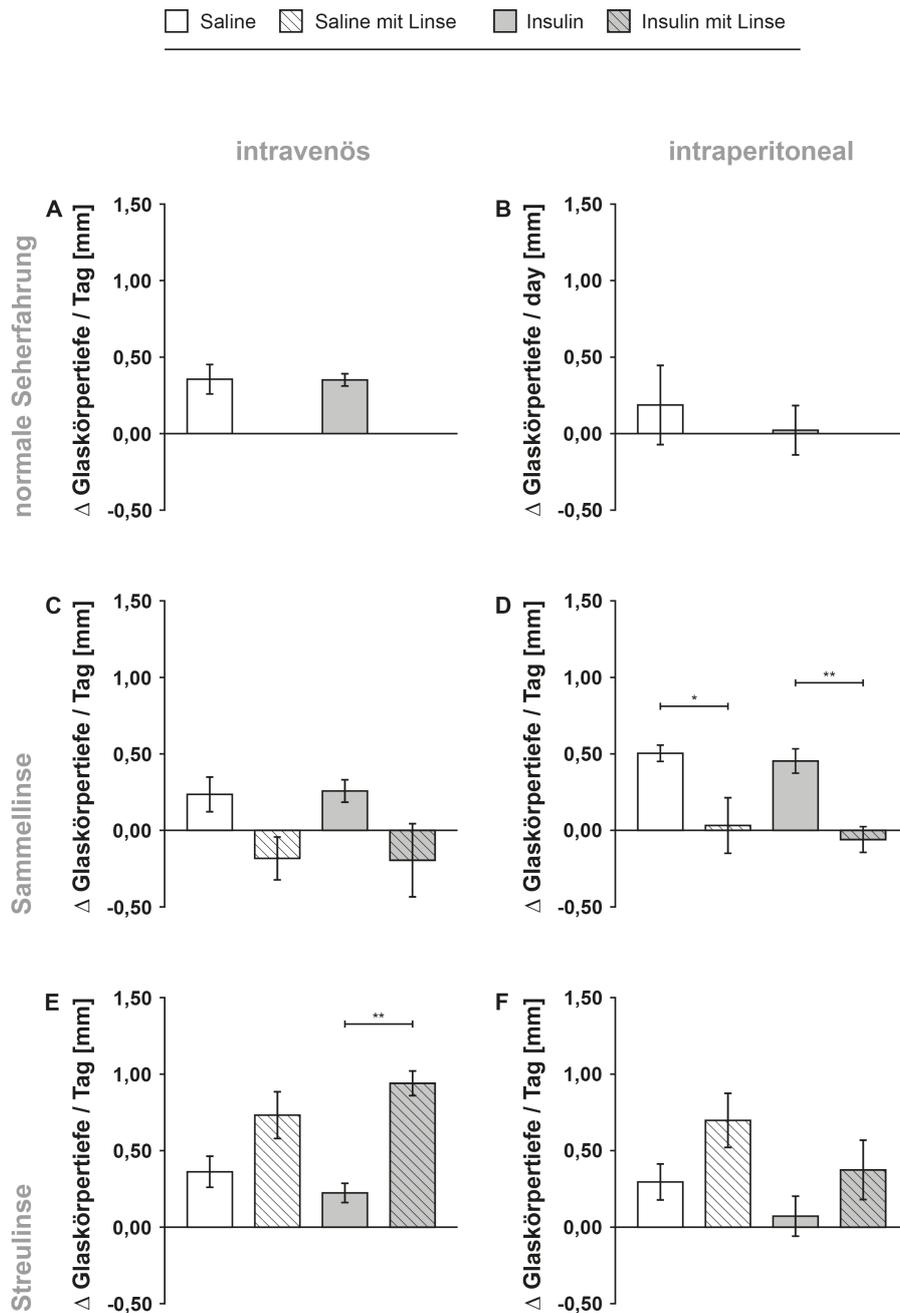


Abbildung 15: Darstellung der auf die Versuchstage normierten Änderung der Glaskörpertiefe zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen: (A) IV-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (B) IP-injizierte Tiere mit normaler Seherfahrung; (C) monokular mit einer Sammellinse behandelte IV-injizierte Tiere; (D) monokular mit einer Sammellinse behandelte IP-injizierte Tiere; (E) monokular mit einer Streulinse behandelte, IV-injizierte Tiere; (F) monokular mit einer Streulinse behandelte, IP-injizierte Tiere. Die Sammellinsenbehandlung der IP-injizierten Tiere resultierte in einer signifikant geringeren Zunahme der Glaskörpertiefe sowohl in den IP- als auch in den IV-injizierten Tieren. Die Streulinsenbehandlung in den Insulin-IV-injizierten Tieren hatte eine signifikant stärkere Zunahme der Glaskörpertiefe zur Folge. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0,05; **P < 0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. n siehe Abb. 11

mit normaler Seherfahrung

nach intravenösen Injektionen

In den IV-injizierten Tieren mit normaler Seherfahrung hatte Insulin keinen Effekt auf die Zunahme der Glaskörpertiefe (t-Test, $P = 0,95$). Die Glaskörpertiefe beider Versuchsgruppen nahm im Mittel ca. 0,03 mm pro Tag zu (Abb. 15A).

nach intraperitonealen Injektionen

Auch in den IP-injizierten Tieren mit normaler Seherfahrung konnte kein Effekt der Insulininjektionen auf die Zunahme der Glaskörpertiefe festgestellt werden (t-Test, $P = 0,62$, Abb. 15B).

mit myopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Ein Effekt der Sammellinse auf die Änderung der Glaskörpertiefe konnte in den IV-injizierten Tieren gezeigt werden (2-way ANOVA, Tabelle 22). Die anschließenden gepaarten t-Tests konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Änderung der Glaskörpertiefe zwischen den linsenbehandelten Augen und den kontralateralen unbehandelten Augen bestätigen (gepaarter t-Test, Saline: $P = 0,15$; Insulin: $P = 0,18$). Jedoch nahm die Glaskörpertiefe der linsenbehandelten Augen ab, während die der unbehandelten Augen zunahm.

Es konnte kein signifikanter Effekt der Insulininjektionen auf die Änderungen der Glaskörpertiefe gezeigt werden (2-way ANOVA, Tabelle 22). Die Augen der Insulin-injizierten Tiere änderten ihre Glaskörpertiefe pro Tag genauso stark wie die der Saline-injizierten Tiere (Abb. 15C).

Tabelle 22: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	< 0,001	< 0,001	0,98
Linse	1	0,009	9,14	0,008

nach intraperitonealen Injektionen

Die Sammellinse hatte einen signifikanten Effekt auf die Änderung der Glaskörpertiefe in den IP-injizierten Tieren (2-way ANOVA, Tabelle 23). Die Glaskörpertiefe der unbehandelten

Augen sowohl der Insulin- als auch der Saline-injizierten Tiere nahm stärker zu als die der linsenbehandelten Augen (gepaarter t-Test, Saline: $t = -3.24$, $df = 4$, $P = 0,032$; Insulin: $t = -5.01$, $df = 4$, $P = 0,008$; Abb. 15D).

Insulin hatte keinen Effekt auf die Zunahme der Glaskörpertiefe (2-way ANOVA, Tabelle 23). Die Zunahme der Glaskörpertiefe war sowohl in den unbehandelten als auch in den linsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere denen der Saline-injizierten Tiere sehr ähnlich.

Tabelle 23: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,001	0,42	0,52
Linse	1	0,012	20,91	0,001

mit hyperopem Defokus

nach intravenösen Injektionen

Die Streulinse hatte einen signifikanten Effekt auf die Zunahme der Glaskörpertiefe der IV-injizierten Tiere (2-way ANOVA, Tabelle 24). Die Glaskörpertiefe der Insulin-injizierten Tiere nahm in den linsenbehandelten Augen pro Tag stärker zu als in den unbehandelten Augen (gepaarter t-Test, $t = 6,20$, $df = 5$, $P = 0,002$; Abb. 15E). Dies stimmt mit dem Unterschied der Refraktionsänderung überein. In den Saline-injizierten Tieren konnte kein signifikanter Effekt der Linse auf die Zunahme der Glaskörpertiefe bestätigt werden (gepaarter t-Test, $P = 0,16$). Jedoch war die Zunahme der Glaskörpertiefe auch in den linsenbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere im Mittel stärker als in den kontralateralen unbehandelten Augen.

Ein Effekt von Insulin auf die Zunahme der Glaskörpertiefe konnte nicht gezeigt werden (2-way ANOVA, Tabelle 24).

Tabelle 24: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	< 0,001	0,022	0,88
Linse	1	0,021	29,34	< 0,001

nach intraperitonealen Injektionen

Wie auch in den IV-injizierten Tieren hatten die Streulinse einen signifikanten Effekt auf das Wachstum der Glaskörpertiefe der IP-injizierten Tiere (2-way ANOVA, Tabelle 25). Die anschließenden gepaarten t-Tests konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied bestätigen (Saline: gepaarter t-Test, $P = 0,12$; Insulin: $P = 0,13$). Die Zunahme der Glaskörpertiefe war sowohl in den Insulin- als auch in den Saline-injizierten Tieren dennoch in den linsenbehandelten Augen stärker als in den unbehandelten Augen (Abb. 15F).

Insulin hatte keinen Effekt auf die Zunahme der Glaskörpertiefe (2-way ANOVA, Tabelle 25), wengleich die Zunahme der Glaskörpertiefe in den Insulin-injizierten Tieren sowohl in den linsenbehandelten als auch in den unbehandelten Augen geringer war als die der Saline-injizierten Tiere.

Tabelle 25: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektionssubstanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,004	3,14	0,095
Linse	1	0,006	5,31	0,034

Tabelle 26: absolute Refraktion und Längen der Kompartimente des Auges für alle Versuchsgruppen zu Versuchsende

Angaben als Mittelwert ± Standardfehler

	IV				Injektion				IP	
	Saline		Insulin		Saline		Insulin		Insulin	
	7 Tage	3 Tage, n = 3	4 Tage, n = 3	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage, n = 3
normale Seherfahrung										
Alter bei Behandlungsbeginn	7 Tage	3 Tage, n = 6	4 Tage, n = 3	7 Tage	3 Tage, n = 3	4 Tage, n = 3	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage	7 Tage, n = 3
Behandlungsdauer, Anzahl Tier										
Refraktion [D]		+1,56 ± 0,31	+3,21 ± 0,51	+2,92 ± 0,46				+1,72 ± 0,55		+3,22 ± 0,65
Achsenlänge [mm]		8,09 ± 0,05	8,12 ± 0,01	8,06 ± 0,03				8,06 ± 0,10		8,06 ± 0,01
Vorderkammertiefe [mm]		1,03 ± 0,03	1,08 ± 0,02	0,98 ± 0,03				1,05 ± 0,06		1,01 ± 0,03
Linsendicke [mm]		2,19 ± 0,08	2,40 ± 0,01	2,02 ± 0,04				2,40 ± 0,08		2,45 ± 0,05
Glaskörpertiefe [mm]		4,87 ± 0,11	4,64 ± 0,03	5,07 ± 0,07				4,61 ± 0,11		4,61 ± 0,03
Sammellinse										
Alter bei Behandlungsbeginn	7 Tage	3 Tage, n = 6	7 Tage	3 Tage, n = 3	4 Tage, n = 1	7 Tage	3 Tage, n = 3	5 Tage, n = 5	16 Tage	5 Tage, n = 5
Behandlungsdauer, Anzahl Tier										
Refraktion [D]		+5,56 ± 0,92	+3,87 ± 0,92	+7,50				+6,07 ± 1,63		+6,48 ± 1,28
Achsenlänge [mm]		8,05 ± 0,12	8,16 ± 0,09	7,76				8,87 ± 0,18		9,02 ± 0,11
Vorderkammertiefe [mm]		1,25 ± 0,07	1,23 ± 0,14	1,09				1,32 ± 0,02		1,29 ± 0,05
Linsendicke [mm]		1,96 ± 0,05	2,01 ± 0,02	2,11				2,39 ± 0,08		2,47 ± 0,06
Glaskörpertiefe [mm]		4,84 ± 0,07	4,92 ± 0,03	4,56				5,16 ± 0,11		5,26 ± 0,11
keine Linse										
kontralateral Sammellinse										
Alter bei Behandlungsbeginn	7 Tage	3 Tage, n = 6	7 Tage	3 Tage, n = 3	4 Tage, n = 1	7 Tage	3 Tage, n = 3	5 Tage, n = 5	16 Tage	5 Tage, n = 5
Behandlungsdauer, Anzahl Tier										
Refraktion [D]		+2,17 ± 0,26	+1,62 ± 0,25	+2,67				+0,35 ± 0,11		+3,77 ± 0,87
Achsenlänge [mm]		8,12 ± 0,08	8,07 ± 0,15	8,00				9,07 ± 0,17		9,31 ± 0,20
Vorderkammertiefe [mm]		1,28 ± 0,04	0,93 ± 0,08	1,14				1,38 ± 0,03		1,15 ± 0,10
Linsendicke [mm]		1,92 ± 0,07	2,13 ± 0,03	1,98				2,28 ± 0,10		2,69 ± 0,10
Glaskörpertiefe [mm]		4,92 ± 0,04	5,01 ± 0,13	4,88				5,42 ± 0,07		5,46 ± 0,09
Streulinse										
Alter bei Behandlungsbeginn	7 Tage	7 Tage, n = 6	7 Tage	4 Tage, n = 3	7 Tage, n = 4	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage, n = 2	7 Tage	7 Tage, n = 2
Behandlungsdauer, Anzahl Tier										
Refraktion [D]		-0,01 ± 0,91	-2,24 ± 1,39	-0,29 ± 0,88				+1,11 ± 1,16		+3,35 ± 1,24
Achsenlänge [mm]		8,75 ± 0,11	8,84 ± 0,11	8,70 ± 0,10				8,55 ± 0,12		8,31 ± 0,06
Vorderkammertiefe [mm]		1,06 ± 0,02	1,48 ± 0,06	1,04 ± 0,01				1,05 ± 0,05		0,98 ± 0,06
Linsendicke [mm]		2,21 ± 0,06	2,01 ± 0,05	2,11 ± 0,06				2,08 ± 0,03		1,97 ± 0,06
Glaskörpertiefe [mm]		5,48 ± 0,14	5,35 ± 0,06	5,54 ± 0,13				5,43 ± 0,11		5,36 ± 0,07
keine Linse										
kontralateral Streulinse										
Alter bei Behandlungsbeginn	7 Tage	7 Tage, n = 6	7 Tage	4 Tage, n = 3	7 Tage, n = 4	7 Tage	3 Tage, n = 3	7 Tage, n = 2	7 Tage	7 Tage, n = 2
Behandlungsdauer, Anzahl Tier										
Refraktion [D]		+2,32 ± 1,00	+3,23 ± 0,56	+2,71 ± 0,34				+3,44 ± 0,56		+4,69 ± 1,98
Achsenlänge [mm]		8,42 ± 0,14	8,29 ± 0,15	8,35 ± 0,10				8,50 ± 0,08		8,22 ± 0,06
Vorderkammertiefe [mm]		1,07 ± 0,05	1,09 ± 0,09	1,06 ± 0,06				1,08 ± 0,03		1,02 ± 0,09
Linsendicke [mm]		2,16 ± 0,04	2,11 ± 0,02	2,20 ± 0,07				2,09 ± 0,04		2,08 ± 0,10
Glaskörpertiefe [mm]		5,20 ± 0,11	5,08 ± 0,08	5,09 ± 0,08				5,33 ± 0,10		5,19 ± 0,10

3.2 Analyse der Insulinkonzentration in Aderhaut und Netzhaut (Insulin-ELISA)

Die Insulinkonzentration in Aderhaut und Netzhaut wurde zehn Minuten nach intravenöser Gabe von Insulin bzw. Saline analysiert. Die auf die Gesamtproteinkonzentration normierte Insulinmenge ist in Abb. 16 dargestellt. Eine im Mittel 2,5fach höhere Insulinkonzentration wurde in den Aderhäuten der Tiere gemessen, denen Insulin injiziert wurde. Der Unterschied zur Insulinkonzentration in den Aderhäuten der Saline-injizierten Tiere war jedoch nicht signifikant (t-Test, $P = 0,095$).

Vergleicht man die Insulinkonzentration zwischen Aderhaut und Netzhaut sowohl der Saline- als auch der Insulin-injizierten Tiere wird deutlich, dass die Insulinkonzentration in der Netzhaut geringer war als in der Aderhaut. Auch in den Netzhäuten wurde kein signifikanter Effekt der Insulininjektion auf die Insulinkonzentration festgestellt (Wilcoxon rank sum, $P = 0,81$).

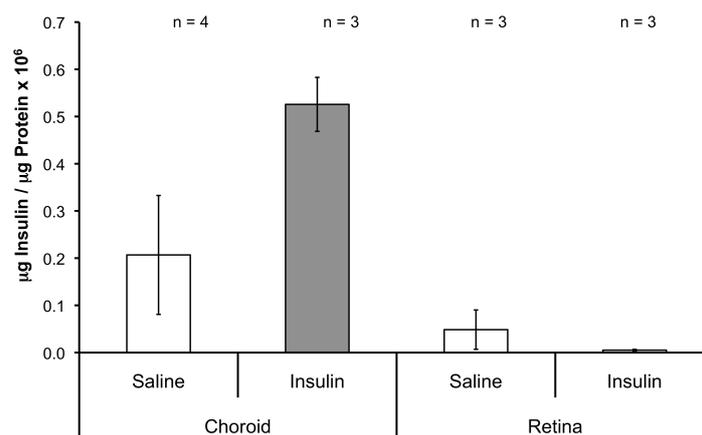


Abbildung 16: Darstellung der auf die Gesamtproteinkonzentration normierte Insulinkonzentration x 10⁶ in Aderhaut und Netzhaut zehn Minuten nach intravenöser Saline- bzw. Insulininjektion. Die Insulinkonzentration war in der Aderhaut der Insulin-injizierten Tieren höher als in den Saline-injizierten Tieren. Die Insulinkonzentration der Netzhaut war geringer als die in der Aderhaut und wurde nicht durch die Injektionssubstanz beeinflusst. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Darüber hinaus wurde die Insulinkonzentration im Glaskörper nach intravitrealer Insulininjektion bestimmt. Diese Daten sind nicht dargestellt, da das im ELISA verwendete Probenvolumen zu groß war, sodass die resultierende Insulinkonzentration nach intravitrealer Insulininjektion außerhalb des Messbereichs lag.

Die sehr geringe Insulinkonzentrationen in der Netzhaut nach intravenöser Injektion legt nahe, dass Insulin die Blut-Augen-Schranke nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen passieren konnte. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und um zu untersuchen, ob Insulin

auch zu einem späteren Zeitpunkt die Blut-Augen-Schranke nicht überqueren konnte wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Mit Hilfe des Western Blots wurde die Aktivität des PI3K- sowie des MAPK/ERK-Signalwegs analysiert.

3.3 Die Aktivierung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs in der Netzhaut nach systemischer Insulininjektion (Western-Blot)

Bindet Insulin an den Insulin- oder IGF-1-Rezeptor kann sowohl der PI3K- als auch den MAPK/ERK-Signalweg aktiviert werden. Kommt es zur Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs wird Erk phosphoryliert, bzw. zur Aktivierung des PI3K-Signalwegs wird Akt phosphoryliert. Sollte Insulin die Blut-Augen-Schranke überwinden müsste zwei Stunden nach Injektion eine Aktivität dieser Signalwege in der Netzhaut nachweisbar sein. In vorhergehenden Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Schaeffel (Penha et al., 2012) wurde bereits nachgewiesen, dass intravitreale Insulininjektionen den PI3K-Signalweg in Kontrolltieren, sowie in Tieren, die mit Streu- oder Sammellinsen behandelt wurden, aktivieren. Außerdem wurde gezeigt, dass der MAPK/ERK-Signalweg durch Insulin in der Netzhaut von Kontrolltieren und Sammellinsen-behandelten Tieren stimuliert wird, aber nicht in Küken, denen Streulinsen vorgesetzt wurden. Die in dieser Arbeit im Western-Blot verwendeten Netzhäute wurden Tieren entnommen denen zwei Stunden vor Präparationen Insulin bzw. Saline IP-injiziert wurde. Die Intensität der Banden des Western-Blots erlaubt eine relative Aussage über die Menge des Proteins in der Probe an das der verwendete Antikörper spezifisch binden konnte. Für die Analyse der Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs ist im Folgenden das Verhältnis der Intensität der Bande der aktiven Erk-Form (pErk) zu der Intensität der Bande des gesamten Erks (im Folgenden Erk abgekürzt) dargestellt. Das Selbe gilt für den PI3K-Signalweg, jedoch ist die Intensität der Bande der aktiven Akt-Form (pAkt) im Verhältnis der Intensität der Bande des Referenz-Proteins Hsp-90 dargestellt.

3.3.1 mit myopem Defokus

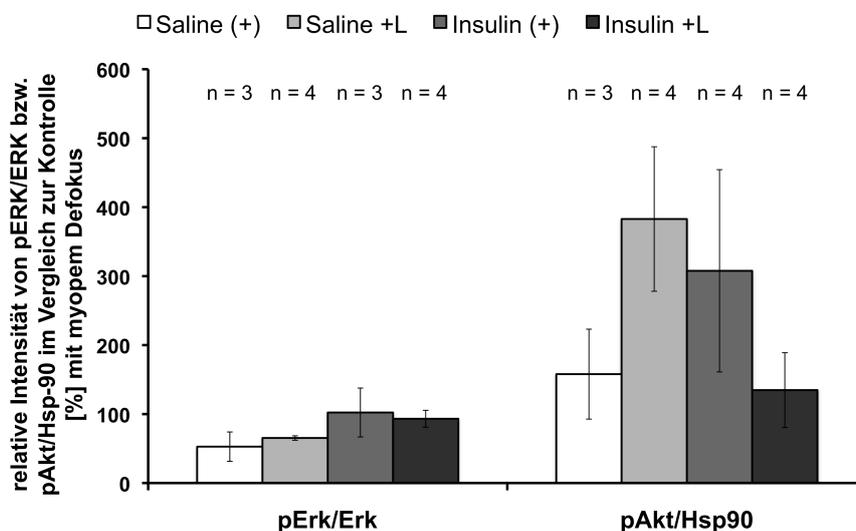


Abbildung 17: Darstellung des Effekts von IP-injiziertem Insulin (zwei Stunden nach Injektion) und Sammellinsenbehandlung auf das Verhältnis von pErk/Erk- und pAkt/Hsp-90 in der Netzhaut. (+L) Sammellinsen-behandelte Augen der monokular mit einer Sammellinse behandelten Tiere; (+) unbehandelten Augen, der monokular mit einer Sammellinse behandelten Tiere. Dieselbe Kontrollprobe wurde in jedem Blot zur Normalisierung der Daten verwendet. Das Verhältnis der Intensitäten der Banden ist als Prozentangabe im Vergleich zu dem Verhältnis der Intensitäten der Banden der Kontrollprobe dargestellt. Weder Insulin noch Streulinsen hatten einen signifikanten Effekt auf das Verhältnis von pErk zu Erk, bzw. pAkt zu Hsp-90. Jedoch war das pErk/Erk-Verhältnis in den Insulin-injizierten Tieren leicht erhöht. Das pAkt/Hsp-90 Verhältnis war in den Linsen-behandelten Augen nach intraperitonealer Saline-Injektion höher als in den kontralateralen Kontrollaugen während es bei Insulin-Injektion in den Linsen-behandelten Augen niedriger war Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Es konnte weder ein Effekt der Sammellinse noch der Insulininjektionen auf das Verhältnis von pErk zu Erk in der Netzhaut der monokular mit einer Sammellinse behandelten Tieren nachgewiesen werden (2-way ANOVA, Tabelle 27). Jedoch war das Verhältnis in den Insulin-injizierten Tieren im Vergleich zu den Saline-injizierten sowohl in den linsenbehandelten, als auch in den kontralateralen unbehandelten Augen leicht erhöht (Abb. 17).

Tabelle 27: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Sammellinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,49	2,89	0,12
Linse	1	0,001	0,008	0,93

Auch das Verhältnis von pAkt zu Hsp-90 wurde weder durch die Sammellinse, noch durch die Insulininjektionen signifikant beeinflusst (2-way ANOVA, Tabelle 28). Jedoch war das pAkt/Hsp-90-Verhältnis in der Netzhaut der linsenbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere im Mittel höher (Abb. 17) während es bei den Insulin-injizierten Tieren in der Netzhaut der Sammellinsen-behandelten Augen niedriger war als in den kontralateralen unbehandelten Augen.

Tabelle 28: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Sammellinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des PI3K-Signalwegs

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,460	0,241	0,63
Linse	1	0,187	0,098	0,76

3.3.2 mit hyperopem Defokus

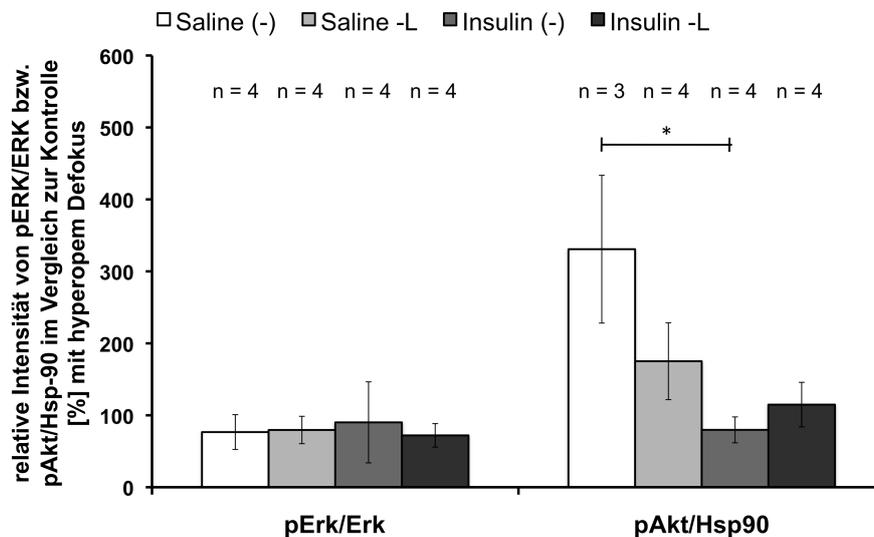


Abbildung 18: Darstellung des Effekts von IP-injiziertem Insulin (zwei Stunden nach Injektion) und Streulinenbehandlung auf das Verhältnis von pErk/Erk- und pAkt/Hsp-90 in der Netzhaut. (-L) Streulinen-behandelte Augen der monokular mit einer Streulinse behandelten Tiere; (-) unbehandelten Augen, der monokular mit einer Streulinse behandelten Tiere. Dieselbe Kontrollprobe wurde in jedem Blot zur Normalisierung der Daten verwendet. Das Verhältnis der Intensitäten der Banden ist als Prozentangabe zu dem Verhältnis zu den Intensitäten der Banden der Kontrollprobe dargestellt. Das pErk/Erk-Verhältnis wurde weder durch Streulinenbehandlung noch durch Insulininjektionen beeinflusst. Insulininjektionen hatten eine Abnahme des Verhältnisses von pAkt zu Hsp-90 in den unbehandelten Augen zur Folge. Auch in den linsenbehandelten Augen war das Verhältnis von pAkt zu Hsp-90 in den Insulin-injizierten Tieren geringer als in den Saline-injizierten Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (*P < 0,05; **P < 0,01). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Es konnte weder ein Effekt der Streulinse noch der Insulininjektionen auf das Verhältnis von pErk zu Erk in der Netzhaut der Tiere nachgewiesen werden die monokular eine Streulinse trugen (2-way ANOVA, Tabelle 29). Das Verhältnis von pErk zu Erk in den Netzhäuten der Insulin-injizierten Tiere entsprach dem Verhältnis, das auch in den Netzhäuten der Saline-injizierten Tieren vorlag (Abb. 18).

Tabelle 29: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Streulinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	0,004	0,019	0,89
Linse	1	0,023	0,12	0,73

Auch auf das Verhältnis von phosphoryiertem Akt zu Hsp-90 hatte die Streulinsenbehandlung keinen signifikanten Effekt (2-way ANOVA, Tabelle 25, Abb. 18). Anders als beim MAPK/ERK-Signalweg hatte Insulin einen signifikanten Effekt auf das Verhältnis von pAkt zu Hsp-90 (2-way ANOVA, Tabelle 30): In den unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tieren war das Verhältnis von pAkt zu Hsp-90 zwei Stunden nach Insulininjektion ca. 65% geringer, als in den Saline-injizierten Tieren (t-Test, $t = 3,60$, $df = 5$, $P = 0,016$). Es ist jedoch zu beachten, dass die 2-way ANOVA mit nicht normalverteilten Daten erfolgte, da selbst nach Transformation keine normalverteilten Daten vorlagen. Auch in den Netzhäuten der linsenbehandelten Augen war das Verhältnis von pAkt zu Hsp-90 in den Insulin-injizierten Tieren im Mittel geringer als in den Saline-injizierten Tieren. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (Wilcoxon ungepaart, $P = 0,31$).

Tabelle 30: Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Streulinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des PI3K-Signalwegs

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Injektionssubstanz	1	4,34	4,75	0,049
Linse	1	0,45	0,50	0,495

3.4 Der systemische Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration im Glaskörper und Blut

Ob systemisch injiziertes Insulin zehn Minuten bzw. zwei Stunden nach Injektion einen Effekt auf die Glukosekonzentration im Glaskörper und im Blut hat wurde analysiert, indem die Glukosekonzentrationen schnellstmöglich am letzten Versuchstag nach Dekapitierung (im Blut) bzw. nach der Entnahme des Auges (im Glaskörper) gemessen wurden.

3.4.1 mit normaler Seherfahrung

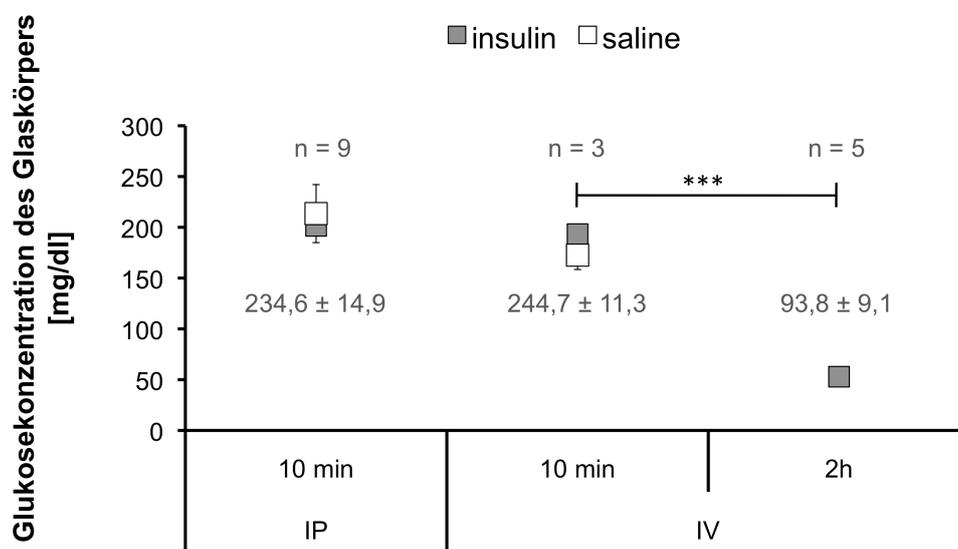


Abbildung 19: Darstellung des Effekts von systemisch injiziertem Insulin auf die Glukosekonzentration im Glaskörper und Blut (Werte unterhalb der Datenpunkte) zehn Minuten bzw. zwei Stunden nach Injektion in Tieren mit normaler Seherfahrung. Zehn Minuten nach Insulininjektion war kein Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration sichtbar. Die Glukosekonzentration im Glaskörper der IV-injizierten Tiere war zwei Stunden nach Injektion signifikant geringer als nach zehn Minuten (t-Test, $t = -7,76$, $df = 6$, $P < 0,001$). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind dargestellt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Die Glukosekonzentration im Glaskörper der Tiere mit normaler Seherfahrung betrug $176,2 \pm 14,1$ mg/dl in den Saline-IV-injizierten Tieren und $213,5 \pm 28,6$ mg/dl in den Saline-IP-injizierten Tieren (Abb. 19). Sie war nicht signifikant unterschiedlich (t-Test, $P = 0,95$). In den Insulin-injizierten Tieren mit normaler Seherfahrung hatte Insulin zehn Minuten nach Injektion keinen Effekt auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers im Vergleich zu den Saline-injizierten Tieren (IP-injizierte Tiere t-Test, $P = 0,64$; IV-injizierte Tiere: t-Test, $P = 0,22$). Der Effekt von Insulin wird deutlich, wenn man die Glukosekonzentration des Glaskörpers zehn Minuten und zwei Stunden nach intravenöser Insulininjektion vergleicht: die Glukosekonzentration des Glaskörpers war zwei Stunden nach Insulininjektion signifikant

geringer als zehn Minuten nach Injektion (t-Test, $t = -7,76$, $df = 6$, $P < 0,001$). Im Vergleich zur Glukosekonzentration des Blutes war die Glukosekonzentration im Glaskörper sowohl zehn Minuten, als auch zwei Stunden nach Insulininjektion geringer. Ob ein signifikanter Unterschied vorlag wurde nicht getestet, da nicht für jedes Tier die Glukosekonzentration des Blutes und des Glaskörpers gemessen wurde.

3.4.2 mit Defokus

In den linsenbehandelten Tieren konnte kein signifikanter Effekt der Linse auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers festgestellt werden (2-way ANOVA, Tabelle 31). Die Glukosekonzentration im Glaskörper entsprach im Mittel 191,6 mg/dl in den Augen der Saline-injizierten Tiere (Abb. 20).

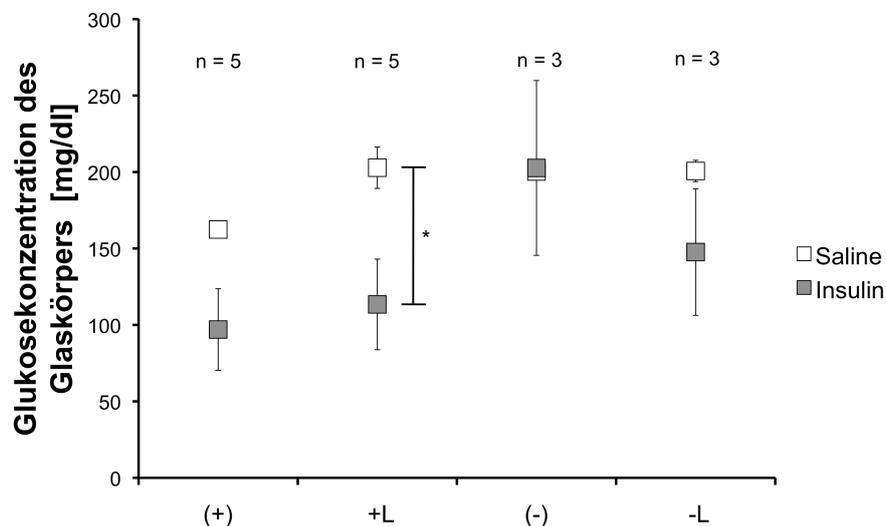


Abbildung 20: Darstellung des Effekts von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers in linsenbehandelten Tieren. Linsen hatten keinen Effekt auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers. Insulininjektionen hatten eine signifikant geringe Glukosekonzentration in den Glaskörpern der Sammellinsen behandelten Augen zur Folge. In den anderen Behandlungsgruppen war der Effekt von Insulin nicht signifikant. (+) bzw. (-): unbehandeltes Auge der Tiere, die monokular mit einer Linse behandelt wurden; +L bzw. -L : mit einer Sammellinse bzw. einer Streulinse behandeltes Auge.

Zwei Stunden nach Injektion konnte, wie auch in den Tieren mit normaler Seherfahrung, ein Effekt der Insulininjektion auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers festgestellt werden (2-way ANOVA, Tabelle 31). Der Effekt von Insulin wurde in den Tieren sichtbar, die monokular eine Sammellinse trugen (Abb. 20): Insulin senkte die Glukosekonzentration des Glaskörpers der Sammellinsen-behandelten Augen um ca. 90 mg/dl im Vergleich zu den Sammellinsen-behandelten Augen der Saline-injizierten Tiere (t-Test, $t = 2,74$, $df = 8$, $P = 0,025$). Auch in den kontralateralen, unbehandelten Augen der Sammellinsen-behandelten Insulin-injizierten Tiere fiel die Glukosekonzentration um ca. 65 mg/dl in Folge der

Insulininjektion ab. Jedoch war der Unterschied zu den unbehandelten Augen der Salineinjizierten Tiere, die monokular eine Sammellinse trugen, nicht signifikant (Wilcoxon ungepaart, $P = 0,14$).

In den monokular mit einer Streulinse behandelten Insulininjizierten Tieren war der Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers weniger stark ausgeprägt. In den mit Streulinsen behandelten Augen der Insulininjizierten Tiere fiel die Glukosekonzentration nach zwei Stunden um ca. 50 mg/dl im Vergleich zu der Glukosekonzentration der Salineinjizierten Tiere ab (t-Test, $P = 0,33$). In den kontralateralen, unbehandelten Augen der Streulinsenbehandelten Tiere hatte Insulin keine Abnahme der Glukosekonzentration des Glaskörpers im Vergleich zu den unbehandelten Augen der Salineinjizierten Tiere zur Folge.

Tabelle 31 Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Insulininjektion auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers

Variationsquelle	Freiheitsgrade	Mittlere Quadratsumme	F-Wert	P-Wert
Linse	3	1,16	1,72	0,19
Injektionssubstanz	1	2,38	10,61	0,003

4 Diskussion

Das Wachstum des Auges scheint hauptsächlich lokal von der Netzhaut reguliert zu werden (Diether & Schaeffel, 1997; Schaeffel & Diether, 1999; Zhu et al., 2005). Einige Transmitter und Neuromodulatoren, die an der Regulation des Augenlängenwachstums beteiligt sind, sind bereits nachgewiesen worden. Unter anderem wurde Glukagon als Stoppsignal für das Wachstum des Auges identifiziert. Intravitreal injiziertes Insulin stimulierte das Augenlängenwachstum, vor allem der Vorderkammer und Linse stimulierte, und führte zur Entstehung von Kurzsichtigkeit. Der Effekt von intravitreal injiziertem Insulin wurde verstärkt, wenn dem Auge zusätzlich ophthalmische Linsen vorgesetzt wurden: in Kombination mit Sammellinsen, die alleine die Entstehung von Weitsichtigkeit induzieren, hemmte Insulin nicht nur die Entstehung von Weitsichtigkeit, sondern induzierte starke Kurzsichtigkeit. In Kombination mit einer Streulinsenbehandlung, wurden die Insulin-injizierten Tiere kurzsichtiger als durch die Linsen alleine (siehe Kapitel 1.1.3 Welche Moleküle steuern das Augenlängenwachstum? – Insulin). Da Cordain (2002) einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Insulinkonzentration im Blut und einer daraus resultierenden Myopie darlegt, wurde untersucht, ob systemisch injiziertes Insulin dieselben Effekte wie intravitreal injiziertes Insulin auf das Wachstum des Auges und damit einhergehend auf die Emmetropisierung im Tiermodell des Haushuhns hat. Dazu wurde Insulin im Laufe der Versuchswoche mehrmals systemisch (intravenös oder intraperitoneal) injiziert und die Refraktion, sowie die Längen der Kompartimente der Augen zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende gemessen. Sollte systemisch injiziertes Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren können, hätten vergleichbare Effekte auf die Refraktion, das Wachstum der Vorderkammer, sowie die Zunahme der Linsendicke beobachtet werden müssen. Da die Menge an systemisch injiziertem Insulin dieselbe Insulinkonzentration im Blut zur Folge hatte, die bei Feldkaemper et al. (2009) durch die Injektion der größten getesteten Insulinmenge im Glaskörper resultierte, werden die Ergebnisse hauptsächlich mit denen von Feldkaemper et al. diskutiert. Da der Effekt von Insulin in vorherigen Versuchen verstärkt in Kombination mit einer Linsenbehandlung sichtbar wurde, wurden einige Versuchsgruppen monokular mit einer Linse (+7 D oder -7 D) behandelt.

4.1 Der Effekt von Insulin auf die Entwicklung des Auges mit normaler Seherfahrung und auf die Entwicklung mit hyperopem oder myopem Defokus

mit normaler Seherfahrung

Zum Zeitpunkt des Schlupfes sind Küken weitsichtig (Irving, Sivak, Curry, & Callender, 1996). Erst nach dem Schlupf findet die Emmetropisierung statt. Diese erfolgt, indem das Auge wächst, sowie Hornhaut und Linse abflachen (Irving, Sivak, & Callender, 1992; Irving et al., 1996) bis die Bildebene, für parallel in das Auge eintretende Lichtstrahlen, auf der Netzhaut zu liegen kommt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Saline-injizierten Tiere mit normaler Seherfahrung zeigten im Mittel eine Abnahme der Weitsichtigkeit, ein Wachstum aller Kompartimente des Auges, sowie damit einhergehend ein Wachstum der Achsenlänge des Auges. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass das Auge nach dem Schlupf emmetropisiert und die Emmetropisierung mit einem Wachstum aller Kompartimente des Auges sowie mit einer Änderung der Refraktion einhergeht. Die Emmetropisierung war zehn, bzw. elf Tage nach Schlupf noch nicht vollständig abgeschlossen, da die Augen der Saline-injizierten Tiere weiterhin hyperop waren (Tabelle 26). Die absolute Refraktion dieser Tiere an Tag zehn, bzw. elf nach dem Schlupf war jedoch bereits weniger hyperop als Tiere desselben Alters bei Irving et al. (1996).

Intravenöse Insulin-Injektionen bewirkten in den Tieren mit normaler Seherfahrung eine Zunahme der Hyperopie. Diese ging mit einer Abnahme der Vorderkammertiefe und in Folge dessen mit einer geringeren Wachstumsrate der Achsenlänge des Auges einher. Auch in den IP-injizierten Tieren resultierten die Insulininjektionen in Hyperopie. Die Weitsichtigkeit resultierte aus der Abnahme der Vorderkammertiefe, wenngleich der Effekt von Insulin auf die Refraktionsänderung sowie die Abnahme der Vorderkammertiefe nicht signifikant war. Fehlende Signifikanzen in der Versuchsgruppe der IP-injizierten Tiere im Vergleich zu den IV-injizierten Tieren könnten auf die geringe Gruppengröße der IP-injizierten Tiere zurückzuführen sein. Darüber hinaus konnte in den IP-injizierten Versuchsgruppen nicht kontrolliert werden, ob die Injektionen in die Bauchhöhle oder versehentlich in dem Darm erfolgten. Bei Injektionen in den Darm ist davon auszugehen, dass Insulin durch Proteasen im Verdauungstrakt gespalten wurde und dadurch selbst nach anschließender Aufnahme in die Blutbahn wirkungslos war. Zusammenfassend war der Effekt der erhöhten systemischen Insulinkonzentration dem Effekt einer erhöhten intravitrealen Insulinmenge entgegengesetzt:

systemische Insulininjektionen induzierten Hyperopie statt Myopie und eine Abnahme der Vorkammertiefe statt einer Zunahme der Vorderkammertiefe.

mit myopem Defokus

Befestigt man eine Sammellinse vor einem emmetropen Auge wird das einfallende Licht stärker gebündelt, sodass die Bildebene bei Fernakkomodation vor der Netzhaut zu liegen kommt (myoper Defokus). Das Vogelauge gleicht einen myopen Defokus zunächst durch eine Verdickung der Aderhaut aus (Wildsoet & Wallman, 1995), was mit einer Minderung der Glaskörpertiefe einhergeht (Sivak et al., 1990; Zhu et al., 2005). Dadurch wird die Netzhaut der Bildebene angenähert wird, bis sie auf Höhe der Bildebene zu liegen kommt. Auf lange Sicht wird die Wachstumsrate des Auges reduziert, sodass Bildebene und Netzhaut erneut zur Deckung kommen. Hat das Auge den durch die Sammellinse erzeugten myopen Defokus ausgeglichen normalisiert sich die Dicke der Aderhaut (Wallman & Winawer, 2004) und das Auge ist nach Abnahme der Sammellinse hyperop.

Die Sammellinsen-behandelten Augen der Tiere, denen Saline injiziert wurde, zeigten in der vorliegenden Arbeit die erwartete Kompensation der Linsen, wengleich die Refraktionsänderung lediglich in den IV-injizierten Tieren signifikant verschieden zu der Refraktionsänderung der kontralateralen unbehandelten Augen war. Laut Irving et al. (1992) erfolgt eine langsamere Kompensation der Linsen, je älter die Tiere zu Versuchsbeginn sind. Dies könnte die fehlende Signifikanz in der Refraktionsänderung in den IP-injizierten Tieren erklären, da die Versuchstiere bei Versuchsbeginn bereits eine Woche älter waren, als die Tiere der IV-injizierten Versuchsgruppe. Die absolute Refraktion der linsenbehandelten Augen der IV-injizierten Tiere fiel zu Versuchsende geringer aus als die der IP-injizierten Tiere (Tabelle 26). Da die IV-injizierten Tiere jedoch lediglich drei Tage mit einer Linse behandelt wurden, kann davon ausgegangen werden kann, dass nach fünf Behandlungstagen die Hyperopie ebenso hoch wie in den IP-injizierten Tieren gewesen wäre. Die Refraktionsänderung pro Tag entspricht sowohl in den IV- als auch in den IP-injizierten Tieren in etwa der, die Feldkaemper et al. (2009) und Penha et al. (2012) mit +7 D Linsenbehandlung gemessen haben. Sie resultierte hauptsächlich aus einer Abnahme der Glaskörpertiefe, wengleich der Unterschied lediglich bei den IP-injizierten Tieren signifikant war. Die Refraktion der kontralateralen unbehandelten Augen änderte sich über die Versuchszeit sowohl bei den IV- als auch bei den IP-injizierten Tieren kaum. Geht man davon aus, dass das Auge bei Schlupf hyperop ist und nach dem Schlupf emmetropisiert ist die geringe Refraktionsänderung, auch im Vergleich zu der Refraktionsänderung der Tiere mit normaler Seherfahrung, eventuell als kontralateraler Effekt der Linse zu interpretieren, der von Wildsoet et al. (1995) beschrieben wurde.

Systemisch injiziertes Insulin hatte keinen signifikanten Effekt auf die Kompensation der Sammellinsen. Die Hyperopie in den Sammellinsenbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere resultierte wie auch bei den Saline-injizierten Tieren aus einer geringeren Zunahme der Glaskörpertiefe („IP-Sammellinse“ signifikant, „IV-Sammellinse“ nicht signifikant). Die kontralateralen unbehandelten Augen der Insulin-IP injizierten Tiere wurden jedoch im Mittel weitsichtiger, als die der Saline-IP injizierten Tiere - ein Trend, der bei den Tieren mit normaler Seherfahrung signifikant war. Die Zunahme der Hyperopie in den unbehandelten Augen der Insulin-IP injizierten Tiere resultierte, wie auch bei den Tieren mit normaler Seherfahrung, aus einem geringeren Wachstum der Vorderkammer. In den IV-injizierten Tieren konnte der Trend zur Hyperopie und zur Abnahme der Vorderkammertiefe nicht festgestellt werden.

Wird Insulin intravitreal in ein Auge injiziert, das einen myopen Defokus erfährt, wird die durch die Sammellinse hervorgerufene Hyperopie verhindert, bzw. das Auge bei hohen Insulinkonzentrationen myop. Zudem bewirkt Insulin auch in diesen Augen eine Zunahme der Vorderkammertiefe, der Linsendicke und der Achsenlänge und verhindert die Abnahme der Glaskörpertiefe, wie sie in Sammellinsenbehandelten Augen, durch ein Verdicken der Aderhaut, hervorgerufen wird.

Eine systemische Erhöhung der Insulinmenge beeinflusst die Kompensation der Linsen und das Augenlängenwachstum im Gegensatz dazu nicht. Die Ergebnisse stimmen somit nicht mit den Beobachtungen überein, die gemacht werden, wenn Insulin in den Glaskörper eines Auges, das einen myopen Defokus erfährt, injiziert wird.

mit hyperopem Defokus

Befestigt man eine Streulinse vor einem Auge wie das in das Auge einfallende Licht stärker gestreut, sodass die Bildebene bei Fernakkommodation in einem emmetropen Auge hinter der Netzhaut zu liegen kommt (hyperoper Defokus). Das Auge gleicht den hyperopen Defokus zunächst durch eine Verdünnung der Aderhaut aus, sodass die Netzhaut der Bildebene angenähert wird. Auf lange Sicht wird die Wachstumsrate (vor allem der Glaskörpertiefe) des Auges beschleunigt, sodass die Netzhaut letztendlich erneut mit der Bildebene zur Deckung kommt, während die Aderhaut auf ihre normale Dicke wächst (Wallman & Winawer, 2004). Hat das Auge den hyperopen Defokus ausgeglichen ist das Auge nach Abnahme der Linse myop.

Auch in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen bewirkten die Streulinsen in den Saline-injizierten Tieren Myopie, wobei die Refraktionsänderung in den IP-injizierten Tieren stärker war, und in etwa der Refraktionsänderung entsprach, die auch von Feldkaemper et al. (2009) und Penha et al. (2012) nach Streulinsenbehandlung (-7 D) gemessen wurde. Ein

signifikanter Unterschied zu den kontralateralen unbehandelten Augen war in dieser Arbeit jedoch nicht vorhanden. Die geringe Kompensation der Streulinse in den IV-injizierten Tieren könnte darin begründet sein, dass zeitgleich im selben Versuchsraum ein Experiment durchgeführt wurde, bei dem Küken unter hoher Lichtintensität gehalten wurden. Diese Behandlung besitzt einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Kurzsichtigkeit (Cohen, Belkin, Yehezkel, Solomon, & Polat, 2011). Eventuell war die Abschirmung des Käfigs nicht ausreichend. Betrachtet man die absolute Refraktion der IP-injizierten Tiere zu Versuchsende (Tabelle 26) wird deutlich, dass eine dreitägige Linsenbehandlung nur sehr geringe Refraktionsänderungen in Richtung Myopie zu Folge hatte und das Auge zu Versuchsende weiterhin hyperop war. Nach einer siebentägigen Linsenbehandlung konnte eine vollständige Kompensation der Linse festgestellt werden. Wie zu erwarten war die Myopie der linsenbehandelten Augen auf ein verstärktes Wachstum der Glaskörpertiefe und einer damit einhergehenden stärkeren Zunahme der Achsenlänge (zumindest in den IV-injizierten Tieren) zurückzuführen, die jedoch nicht signifikant war.

In den unbehandelten Augen der Saline-IV-injizierten Tiere änderte sich die Refraktion kaum, während eine Abnahme der Refraktion in den unbehandelten Augen der Saline-IP-injizierten Tiere gemessen wurde, die jedoch geringer war, als die Refraktionsänderung der kontralateralen linsenbehandelten Augen. Die Länge aller Kompartimente, bis auf die Vorderkammer, nahm im Laufe der Versuchstage zu. Das Wachstum der Vorderkammer in den IV-injizierten Tieren entsprach nicht den Erwartungen aus der Literatur. Sowohl in den linsenbehandelten, als auch in den kontralateralen unbehandelten Augen der Saline IV-injizierten Tiere wurde eine Abnahme der Vorderkammertiefe gemessen. Jedoch sollte die Vorderkammertiefe sowohl in den linsenbehandelten Augen, als auch in den kontralateralen Augen zunehmen, da kein Effekt der Linse auf die Vorderkammertiefe bekannt ist, und ein Wachstum aller Kompartimente der Emmetropisierung zugrunde liegt. Auch dies ist möglicherweise ein Resultat der hohen Lichtintensität, die während des Versuchs im Versuchsraum vorherrschte. Ein kontralateraler Effekt der Linse scheint denkbar, da die Refraktionsänderung in den unbehandelten Augen der IP-injizierten Tiere etwas stärker war als die der Tiere mit normaler Seherfahrung.

Auch bei den Insulin-injizierten Tieren resultierte die Linsenbehandlung in Myopie. Die Refraktion der linsenbehandelten Augen entsprach der Refraktionsänderung der Saline-injizierten Tiere und war in den IV-injizierten Tieren signifikant verschieden zu der Refraktion der kontralateralen Augen. Eine Überkompensation der Linse aufgrund der Insulininjektion war demnach nicht feststellbar. In den linsenbehandelten Augen der IP-injizierten Tiere war die myope Refraktionsänderung der Insulin-injizierten Tiere schwächer als die der Saline-

injizierten Tiere und nicht signifikant verschieden zur Refraktionsänderung des kontralateralen Auges. Die Entstehung der Myopie, sowohl in den IV als auch in den IP-injizierten Tieren, ging mit einer Zunahme der Glaskörpertiefe und einem stärkeren Wachstum der Achsenlänge einher, wenngleich dies lediglich bei den IV-injizierten Tieren signifikant war. Die Vorderkammertiefe der Insulin-injizierten nahm in den IP-injizierten Tieren genauso stark zu wie in den Saline-injizierten Tieren. In den Insulin-IV-injizierten Tieren konnte, anders als bei den Saline-IV-injizierten Tieren, auch eine Zunahme der Vorderkammertiefe gemessen werden. Da die Abnahme der Vorderkammertiefe in den Saline-IV-injizierten Tieren nicht den Erwartungen aus der Literatur entspricht und eventuell durch die hohen Lichtintensitäten im Versuchsraum beeinflusst wurde ist der Effekt von Insulin auf das Wachstum der Vorderkammer in dieser Versuchsgruppe schwer interpretierbar. Jedoch wurden die unbehandelten Augen der Insulin-injizierten Tiere im Vergleich zu den Saline-injizierten Tieren weitsichtig. Dies war die Folge eines, wenn auch nicht signifikant, geringeren Wachstums der Glaskörpertiefe, und in den IV-injizierten Tieren im Mittel geringeren Wachstums der Vorderkammertiefe. Die hyperope Refraktionsänderung entspricht der Refraktionsänderung, die in Folge der Insulininjektionen in den Tieren mit normaler Seherfahrung gemessen wurde.

Wird Insulin intravitreal in ein Auge injiziert, das einen myopen Defokus erfährt, erfolgt eine Überkompensation der Linse (Feldkaemper et al., 2009). Insulin bewirkt in diesen Augen eine Zunahme der Vorderkammertiefe, der Linsendicke und der Achsenlänge des Auges. Ein zusätzlicher Effekt von Insulin auf die Zunahme der Glaskörpertiefe bei Streulinsenbehandlung ist nicht bekannt. Demnach sind die in dieser Arbeit beschriebenen systemischen Effekte zu den Effekten von intravitreal injiziertem Insulin verschieden.

Fazit

Die folgende Tabelle soll eine Übersicht geben, welche Effekte systemisch injiziertes Insulin auf das Wachstum und die Refraktionsänderung des Auges hatte und welche Effekte intravitreal injiziertes Insulin hervorruft. Dargestellt sind die Änderungen zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende im Vergleich zu Saline-injizierten Tieren. Auf einen Vergleich der Refraktionsänderung und Wachstum der Kompartimente des Auges mit Linsenbehandlung wird verzichtet, da kein zusätzlicher Effekt von systemisch injiziertem Insulin in Kombination mit Linsenbehandlungen nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 32: Der Effekt von intravitreal injiziertem & systemisch injiziertem Insulin in Tieren mit normaler Seherfahrung. Effekte für intravitreal injiziertes Insulin aus Feldkaemper et al. (2009) (höchste Insulinkonzentration). In der Tabelle sind ausschließlich signifikante Unterschiede dargestellt. (+): unbehandeltes kontralaterales Auge der Sammellinsen-behandelten Tiere; IV: intravenöse Injektionen; IP: intraperitoneale Injektionen

	Insulin intravitreal injiziert	Insulin systemisch (IV/IP) injiziert
Refraktion	Refraktionsänderung zu Myopie	Refraktionsänderung zu Hyperopie (IV)
Vorderkammertiefe	↑	↓ IV ↓ (+) IP
Linsendicke	↑	-
Glaskörpertiefe	-	-
Achsenlänge	↑	↓ IV

Tabelle 32 verdeutlicht, dass der Effekt von systemisch injiziertem Insulin bei allen gemessenen Parametern dem Effekt von intravitreal-injiziertem Insulin entgegengesetzt war. Systemisch injiziertes Insulin hatte in einigen Behandlungsgruppen sowohl einen Effekt auf die Refraktion als auch auf das Wachstum der Vorderkammertiefe. Insulin hat demnach nicht als Wachstumssignal agiert, sondern im Gegenteil, eher das Wachstum des Auges unterbunden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine systemische Erhöhung der Insulinmenge die experimentell induzierte Entwicklung von Kurzsichtigkeit nicht beeinflusst. Die Ergebnisse legen nahe, dass durch die erhöhte systemische Insulinkonzentration Sekundärprozesse beeinflusst wurden (wie z. B. die Glukosekonzentration im Blut und im Glaskörper siehe unten), die nachfolgend die Entstehung von Hyperopie bewirkten. Das ein Effekt von systemisch injiziertem Insulin hauptsächlich in den Tieren mit normaler Seherfahrung sichtbar wurde könnte darauf hindeuten, dass die postulierten Sekundärprozesse durch Signale, die von der Linse generiert wurden, unterdrückt oder überlagert wurden.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene schlechte Korrelation zwischen Achsenlängenänderung und Refraktionsänderung kann mehrere, vor allem messtechnische, Gründe haben. Des Vor allem die Ultraschallmessung erfordert viel Übung. Bei der im Labor eingesetzten Methode kann nicht überprüft werden, ob die Ultraschallmessung entlang der optischen Achse („on-axis“) erfolgte. Wird die Ultraschallsonde schief aufgesetzt, wird die Achsenlänge in der Peripherie statt im Zentrum gemessen. Dies führt bei der Messung der Längen der verschiedenen Kompartimente zu Fehlern.

Ob der Effekt von systemischem Insulin durch die unterschiedlichen Injektionsarten beeinflusst wurde ist fraglich. IV-injiziertes Insulin wird, ohne die Leber passieren zu müssen, per

Blutkreislauf in den Kopf – und damit zu den Augen – transportiert. IP-injiziertes Insulin wird dagegen über die Mesenterialgefäße des Darms in die Blutbahn aufgenommen und über die hepatische Pfortader in die Leber transportiert, bevor es in den Kopf gelangt (Turner, Brabb, Pekow, & Vasbinder, 2011). In der Leber erfolgt der Abbau von Insulin (Duckworth et al., 1988), sodass ein geringerer Effekt von systemischem Insulin nach IP-Injektionen möglich gewesen wären. Da jedoch eine relativ große Insulinmenge systemisch injiziert wurde (normale Insulinkonzentration im Blut des Huhns: 3,58 ng/ml (Sturkie, 1986); induzierte Insulinkonzentration im Blut durch systemische Injektionen: 8,71 µg/ml bei einem geschätzten Blutvolumen von 4,5 ml) ist davon auszugehen, dass nicht die gesamte Insulinmenge von der Leber abgebaut werden konnte.

In Anbetracht der unterschiedlichen Effekte von intravitreal und systemisch injiziertem Insulin auf das Augenlängenwachstum liegt die Vermutung nahe, dass systemisches Insulin die Blut-Augen-Schranke nicht passieren konnte. Um diese Vermutung zu untermauern und um zu bestätigen, dass Insulin erfolgreich systemisch injiziert wurde, wurden Netzhaut und Aderhaut der unbehandelten Augen am letzten Versuchstag zehn Minuten nach Injektion entnommen und die Insulinkonzentration beider Gewebsschichten im Insulin-ELISA bestimmt, sowie die Aktivität der Signalwege, die in der Netzhaut durch intravitreal injiziertes Insulin aktiviert werden, im Western-Blot analysiert.

4.2 Kann Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren?

Analyse der Insulinkonzentration in der Aderhaut und der Netzhaut (Insulin-ELISA)

Shires und Braddock (1992) berichten, dass systemisch injiziertes Insulin die Blut-Augen-Schranke in Ratten passieren kann und dass die Insulinkonzentration des Glaskörpers die Insulinkonzentration des Blutes widerspiegelt. In der vorliegenden Arbeit führten systemische Insulininjektionen nach zehn Minuten zu einer erhöhten Insulinkonzentration in der Aderhaut. Dies lässt die Annahme zu, dass Insulin erfolgreich intravenös verabreicht wurde. Ein Transport von Insulin über die Blut-Augen-Schranke scheint innerhalb der zehn Minuten nach Injektion nicht, oder nur mit einer sehr geringen Transportrate erfolgt zu sein, da die Insulinkonzentration in der Netzhaut nicht erhöht war. Da die Extrazellulärflüssigkeit der Netzhaut, des Glaskörpers und der Flüssigkeiten in hinterer und vorderer Augenkammer nicht durch eine Diffusionsbarriere voneinander getrennt sind (Cunha-Vaz, 1997), sollte Insulin, falls es die Blut-Augen-Schranke passieren kann, auch in der Netzhaut nachweisbar sein. Insulin könnte bei der Präparation der Netzhaut ausgeschwemmt worden sein. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da Netzhaut und Aderhaut gleichermaßen in Ringerlösung

präpariert wurden und demnach auch in der Aderhaut kein erhöhter Insulingehalt hätte nachweisbar sein müssen, vor allem da diese stärker mit Gefäßen durchzogen und die Ausschwemmungswahrscheinlichkeit dadurch erhöht ist.

Shires und Braddock (1992) haben die Insulinkonzentration im Glaskörper und Serum zwei Stunden nach Injektion gemessen. Möglich wäre, dass zehn Minuten zwischen Injektion und Präparation nicht ausgereicht haben, um Insulin über die Blut-Augen-Schranke zu transportieren. Weiter wäre es möglich, dass Insulin an der Blut-Kammerwasser-Schranke in das Auge gelangt ist jedoch in zehn Minuten nicht bis zur Netzhaut diffundieren konnte. Auch wäre es denkbar, dass die Unterschiede in der inneren Blut-Netzhaut-Schranke zwischen Ratten und Hühnern, einen Übertritt von Insulin im Huhn unterbinden. Der Transport von Insulin erfolgt in der Blut-Hirn-Schranke der Maus über Insulintransporter (Banks, Jaspán, & Kastin, 1997). Da Blut-Augen-Schranke und Blut-Hirn-Schranke funktional und morphologisch sehr ähnlich sind (Gerhardt et al., 1996) wäre es möglich, dass der Insulintransporter, der in der Blut-Hirn-Schranke der Maus vorhanden ist auch Teil der Blut-Augen-Schranke der Ratte ist. Dies könnte das Angleichen der Insulinkonzentration des Glaskörpers mit dem des Serums bei Shires et al. (1992) ermöglicht haben. Da die Blut-Augen-Schranken von Ratten und Mäusen Unterschiede zu der des Huhns aufweisen, (beispielsweise die Lokalisation der inneren Blut-Netzhaut-Schranke), ist es möglich, dass diese Unterschiede das Übertreten von Insulin im Huhn verhinderten.

Um ausschließen zu können, dass die Ergebnisse des Insulin-ELIAs nicht von der Zeit zwischen Injektion und Präparation abhängen und um bestätigen zu können, dass Insulin auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht die Blut-Augen-Schranke passiert hatte wurde ein Western-Blot mit dem Lysat von Netzhäuten der Tiere durchgeführt, denen am letzten Versuchstag zwei Stunden vor Präparation Insulin injiziert wurde.

Analyse der Aktivierung der Signalwege, die nach Bindung von Insulin an Insulinrezeptoren der Netzhaut aktiviert werden (Western-Blot)

Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor ändert dieser seine Konformation und aktiviert den PI3K- und/oder den MAPK/ERK-Signalweg in Zellen der Netzhaut. Bekannt ist bereits, dass intravitreal injiziertes Insulin sowohl den PI3K- als auch den MAPK/ERK-Signalweg in der Netzhaut von Küken mit normaler Seherfahrung aktiviert (Penha et al., 2012). Im Western-Blot wurden Netzhäute von Tieren eingesetzt, die monokular mit einer Linse behandelt wurden und denen zwei Stunden vor Präparation Insulin bzw. Saline IP injiziert wurde. Die Aktivierung des PI3K-Signalwegs wurde über das Verhältnis der Intensität der Bande des phosphorylierten Akts (pAkt) - der aktiven Form - zu der Intensität der Bande des Hsp-90 bestimmt (pAkt/Hsp-90-Verhältnis). Hsp-90 ist ein Referenzprotein, dessen

Expression weder in Abhängigkeit von der Linsenbehandlung noch von der Insulininjektion reguliert werden sollte (Nakamura, Singh, Kubo, Chylack, & Shinohara, 2000). Die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs wurde wie bei Penha über das Verhältnis der Intensitäten der Banden von pERK, der aktiven Form, zu der gesamt-Erk-Proteinmenge (pErk/Erk-Verhältnis) im Western-Blot bestimmt.

Laut Penha et al. (2012) haben Linsenbehandlungen keinen signifikanten Effekt auf die Aktivierung des PI3K- und MAPK/ERK-Signalwegs. Somit können die Western-Blot Ergebnisse der unbehandelten Augen der Tiere, deren kontralaterale Augen mit Linsen behandelt wurden, mit den Augen mit normaler Seherfahrung von Penha verglichen werden.

Wie auch bei Penha et al. (2012) hatten weder die Streu- noch die Sammellinsenbehandlungen einen Effekt auf das Verhältnis von pErk zu Erk bzw. pAkt zu Hsp-90, wengleich das pAkt/Hsp-90-Verhältnis in Sammellinsenbehandelten Augen im Mittel höher und in Streulinsenbehandelten Augen geringer war als in den kontralateralen unbehandelten Augen.

Systemisch injiziertes Insulin beeinflusste das pErk/Erk-Verhältnis weder in den linsenbehandelten Augen, noch in den kontralateralen Kontrollaugen. Im Gegensatz dazu hatte Insulin einen hemmenden Effekt auf die Aktivität des PI3K-Signalwegs in den unbehandelten Augen der Tiere, die kontralateral eine Streulinse trugen. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, dass die statistische Analyse mit nicht normalverteilten Daten durchgeführt wurde und das Verhältnis von pAkt/Hsp-90 in den unbehandelten Augen der Saline-injizierten Tiere bereits große interindividuelle Unterschiede zeigte. Es müssten daher weitere Tiere untersucht werden, um den Effekt von Insulin auf die Aktivität des PI3K-Signalwegs zu verifizieren.

Auch in den linsenbehandelten Augen unterschieden sich die Ergebnisse nach systemischer Insulininjektion zu denen nach intravitrealer Insulininjektion bei Penha: Wird Insulin intravitreal in ein Streulinsenbehandeltes Auge injiziert wird in diesen Augen die Aktivität des PI3K-Signalwegs signifikant erhöht. Wird Insulin intravitreal in ein Sammellinsenbehandeltes Auge injiziert bewirkt Insulin eine signifikant stärkere Aktivierung beider Signalwege. Diese Effekte waren nach systemischer Insulininjektion nicht zu beobachten.

Systemische Insulininjektionen hatten zwei Stunden nach Injektion weder in den mit Linsen, noch in den kontralateralen unbehandelten Augen einer Aktivierung der Signalwege zur Folge. Daraus kann geschlossen werden, dass Insulin zwei Stunden nach systemischer Applikation die Blut-Augen-Schranke nicht oder nur in einer sehr geringen Menge passieren konnte.

Da die systemischen Insulininjektionen in einigen Versuchsgruppen, vor allem in den Tieren mit normaler Seherfahrung, signifikante Unterschiede zu den Saline-injizierten Versuchs-

gruppen in der Refraktionsentwicklung und dem Wachstum des Auges zur Folge hatten wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht ob systemisch injiziertes Insulin einen Effekt auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers sowie des Blutes hatte. Jacobsen et al. (2008) legen einen möglichen Zusammenhang zwischen hohen systemischen Glukosekonzentrationen und myopen Refraktionsänderungen dar, sodass ein Effekt von systemisch injiziertem Insulin auf die Glukosekonzentration eventuell zu den beobachteten Effekten geführt haben könnte.

4.3 Der Einfluss von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers und des Blutes

mit normaler Seherfahrung

Insulin agiert im Glukosemetabolismus als Gegenspieler zu Glukagon und bewirkt eine Aufnahme von Glukose vor allem in Leber- und Muskelzellen, sodass die Glukosekonzentration des Blutes absinkt. Da die Glukosespeicher des Gehirns und der Netzhaut im Vergleich zu ihrem Glukoseverbrauch vernachlässigbar sind, hängt der Metabolismus dieser Gewebe vollständig von dem Glukosetransport aus dem Blutkreislauf über die Blut-Augen-Schranke in das Gewebe ab (Kumagai, 1999). Da die Blut-Augen-Schranke eine unkontrollierte Diffusion von Substanzen aus dem Blut in das Auge unterbindet wird Glukose per Glukosetransporter über die Blut-Augen-Schranke befördert. Der wichtigste Glukosetransporter der Blut-Augen-Schranke ist der GLUT-1 Transporter, der zur Familie der "*facilitated-diffusion glucose transporter*" (GLUT-Familie) gehört, und der unter anderem auch in der apikalen und basalen Membran der Endothelzellen des Pektens, welcher einen Teil der Blut-Augen-Schranke im Vogel darstellt, nachgewiesen wurde (Gerhardt et al., 1996; Kumagai, 1999; Takata, 1996). Die Glukosekonzentration des Glaskörpers wurde während der Präparation der Augen, zehn Minuten bzw. zwei Stunden nach systemischer Insulininjektion, gemessen. Die Glukosekonzentration des Glaskörpers entsprach zehn Minuten nach intravenöser Saline-Injektion der von Feldkaemper et al. (2009) gemessenen Glukosekonzentration in den Glaskörpern von Saline-injizierten Tieren zwei Tage nach Injektion. Die Glukosekonzentration des Glaskörpers nach intraperitonealer Injektion war etwas höher, jedoch ist eine Glukosekonzentration zwischen 190 und 220 mg/dl im Blut im Normbereich von Vögeln (Sturkie, 1986) und somit auch im Glaskörper plausibel. Die Glukosekonzentration im Blut war in allen gemessenen Versuchsgruppen höher als die Glukosekonzentration des Glaskörpers.

Insulin hatte zehn Minuten nach Injektion keinen signifikanten Effekt auf die Glukosekonzentration im Glaskörper. Laut Hersteller ist die Wirkung des Insulins nach subcutaner Injektion erst nach 30 Minuten messbar (Quelle: Sanofi Insuman Rapid 40 I.E./ml Durchstechfl., Fachinformation). Nach intravenöser Injektion sollte die Wirkung von Insulin schneller eintreten, da keine Aufnahme aus dem Gewebe in die Blutbahn erfolgen musste. Jedoch entsprach die Glukosekonzentration des Blutes der Insulin-IV injizierten Tiere zehn Minuten nach Insulininjektion dem Literaturwert (Sturkie, 1986). Ein signifikanter Abfall der Glukosekonzentration sowohl im Blut als auch im Glaskörper wurde zwei Stunden nach Insulininjektion gemessen. Dies ist im Rahmen des vom Hersteller angegebenen Zeitfensters der Insulinwirkung mit einer maximalen Wirkung nach ein bis vier Stunden und einer Wirkdauer von bis zu neun Stunden nach subcutaner Injektion (Quelle: Sanofi Insuman Rapid 40 I.E./ml, Fachinformation). In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Menge des intravenös injizierten Insulins so berechnet, dass die erreichte Konzentration im Blut der in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe getesteten Insulinkonzentration im Glaskörper entsprach. Somit sollte die Wirkung von Insulin vergleichbar sein. Der Effekt von Insulin auf die Abnahme der Glukosekonzentration des Glaskörpers war zwei Stunden nach systemischer Gabe deutlich stärker (ca. -73% im Vergleich zu zehn Minuten nach Injektion, -57.36% im Vergleich zum Literaturwert von 220mg/dl aus Sturkie et al. (1986)), als der von Feldkaemper et al. (2009) gemessene Effekt zwei Stunden nach intravitrealer Injektion (-12.5%). Laut Feldkaemper war dies die maximale Wirkung von intravitreal injiziertem Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers. Dies deutet darauf hin, dass der Haupteffekt von Insulin im Auge nicht die Reduktion der Glukosekonzentration ist, sondern Insulin eher als Neuromodulator im Auge fungiert. Da alle bisher diskutierten Versuchsergebnisse darauf hinweisen, dass systemisch injiziertes Insulin die Blut-Augen-Schranke nicht oder nur in sehr geringen Mengen überwinden kann, erscheint es plausibel, dass die Glukosekonzentration des Glaskörpers als Folge der verringerten Glukosekonzentration des Blutes abnahm. Vermutlich wurde der Glukosetransport über die Blut-Augen-Schranke eingestellt oder reduziert und die im Auge vorhandene Glukose von den Zellen des Auges verstoffwechselt.

Verschiedene Angaben zu dem Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration des Blutes von Vögeln sind in der Literatur beschrieben. Laut Sturkie et al. (1986) ist Glukagon, das Peptid, das im Vogel die wichtigste Rolle im Glukosemetabolismus übernimmt, während bei Säugern Insulin die Hauptrolle übernimmt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Infusion von Insulin mit Insulinkonzentrationen, die denen in dieser Arbeit beschrieben Versuchen sehr ähnlich waren (22.5 U/kg Akiba et al. (1999) in den beschriebenen Experimenten ca. 20U/kg) die Glukosekonzentration des Blutes um fast die

Hälfte reduzierte (Akiba et al., 1999). Anders als in den hier beschriebenen Experimenten hielt die Hypoglykämie in den Versuchen von Akiba et al. jedoch für mindestens vier Tage an. Andere berichten, dass Insulininjektionen nur einen sehr geringen Effekt auf die Glukosekonzentration des Blutes ausüben und Vögel weitestgehend insulinresistent sind (Stevens, 1996).

Da sowohl intravitreale Insulininjektionen als auch systemische Insulininjektionen zu einer kurzzeitigen Abnahme der Glukosekonzentration im Glaskörper führten, jedoch entgegengesetzte Refraktionsänderungen aus den Injektionen resultierten, scheint die Glukosekonzentration kein wichtiger Faktor bei der Steuerung der Refraktionsentwicklung zu sein. Auf der anderen Seite war das Ausmaß der Reduktion der Glukosekonzentration sehr unterschiedlich. Die geringe Glukosekonzentration im Glaskörper nach systemischer Insulinapplikation könnte weitere Mechanismen in den systemisch injizierten Tieren in Gang gesetzt haben, die das Wachstum des Auges kontrollieren.

Es wäre denkbar, dass aufgrund der stark verringerten Glukosekonzentration im Glaskörper eine verstärkte Glukagonsynthese statt fand, so dass Glukagon zu den beobachteten Effekten geführt haben könnte. Glukagon dient im Auge als Stopp-Signal für das Augenwachstum. Intravitreale Glukagoninjektionen führten bei Vessey et al. (2005) zu Hyperopie. Diese Refraktionsänderung war jedoch nicht signifikant verschieden zur Refraktionsänderung des kontralateralen, Saline-injizierten Auges. Zudem resultierte intravitreal injiziertes Glukagon in einer Zunahme der Linsen- und Aderhautdicke (Zhu & Wallman, 2009) in Augen mit normaler Seherfahrung. Da der Trend zur Hyperopie nach Glukagoninjektion sowie systemischer Insulininjektion übereinstimmt, jedoch kein Effekt von Glukagon auf die Vorderkammer bekannt ist und sich das Wachstum der Linsendicke sowie Glaskörpertiefe in den IV- und IP-injizierten Tieren unterschied, kann nicht davon ausgegangen werden, dass Glukagon den sekundären Effekt von systemisch injiziertem Insulin vermittelte.

mit Defokus

In den Versuchen von Feldkaemper et al. (2009) führte eine einstündige Linsenbehandlung, sowohl mit Sammellinsen als auch mit Streulinsen zu einer Erhöhung der Glukosekonzentration im Glaskörper. Eine signifikant höhere Glukosekonzentration des Glaskörpers konnte nach mehrtägiger Linsenbehandlung in den hier beschriebenen Versuchen nicht gemessen werden. Der Anstieg der Glukosekonzentration nach einstündiger Linsenbehandlung wie es Feldkaemper beschreibt ist demnach eventuell eher ein Signal, dass die Information über eine Verschlechterung der Bildqualität transportiert, jedoch keine Information über die Richtung des Defokus beinhaltet.

Der Effekt von Insulin auf die Glukosekonzentration im Glaskörper war in den Tieren mit normaler Seherfahrung signifikant stärker als in den Augen der linsenbehandelten Tiere, mit Ausnahme der Sammellinsen-behandelten Augen. Kontralaterale meist kurzzeitige Effekte auf die Genexpression und Proteinexpression der kontralateralen Kontrollaugen bei einseitiger Linsenbehandlung sind bereits in der Literatur beschrieben worden (u. a. (Guo, Frost, He, Siegwart, & Norton, 2013; Schippert, Brand, Schaeffel, & Feldkaemper, 2006). Die Ursache und der zugrundeliegende Mechanismus hierfür bleiben jedoch weiterhin unklar. Kontralaterale Effekte könnten auch die Ursache dafür sein, weshalb der systemische Effekt von Insulin auf die Refraktionsänderung und auf das Wachstum der Kompartimente des Auges in Tieren mit normaler Seherfahrung vorhanden war, dieser jedoch nur in den seltensten Fällen auch in den Tieren sichtbar wurde, die monokular mit einer Linse behandelt wurden.

4.4 Schlussfolgerung

Eine systemische Erhöhung der Insulinkonzentration bewirkte in Küken mit normaler Seherfahrung eine hyperope Refraktionsänderung, die mit einer verringerten Wachstumsrate der Vorderkammer einherging und von einer signifikanten Abnahme der Glukosekonzentration zwei Stunden nach Insulininjektion begleitet wurde. Da die Effekte von intravitrealem und systemisch injiziertem Insulin verschieden sind ist nicht davon auszugehen, dass Insulin die Blut-Augen-Schranke passieren konnte - zumindest nicht in größerer Menge. Diese Annahme wird durch Ergebnisse des Insulin-ELSIAs und Western-Blots untermauert. Sekundäre Prozesse, ausgelöst durch die systemischen Insulininjektionen, scheinen für die hyperope Refraktionsänderung sowie die verringerte Wachstumsrate der Vorderkammertiefe verantwortlich gewesen zu sein. Dies könnte die sehr stark gesunkene Glukosekonzentration im Glaskörper, oder andere durch die veränderte Insulinkonzentration beeinflusste noch nicht untersuchte Prozesse, gewesen sein. Die Theorie von Cordain et al. (2002), dass hohe Insulinkonzentrationen im Blut letztendlich in einem verstärkten Wachstum und somit in einem myopen Auge resultieren, kann anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Weshalb der Effekt von Insulin in den linsenbehandelten Versuchsgruppen nicht in Erscheinung trat bleibt unklar. Möglich wäre, dass die weniger stark verringerte Glukosekonzentration im Glaskörper in den Linsenbehandelten Augen zwei Stunden nach Insulininjektion mit ursächlich waren.

Insulin ist nicht nur am Glukosemetabolismus beteiligt, sondern spielt in vielen zellulären Prozessen eine Rolle (z. B: Fettstoffwechsel, Proteinsynthese und einige mehr (Reiter et al.,

2003). Viele weitere sekundäre Effekte von Insulin sind denkbar, die jedoch nicht weiter diskutiert werden, da weitere Experimente erforderlich wären, um eine Beteiligung an der Emmetropisierung des Auges zu bestätigen.

Literaturverzeichnis

- Akiba, Y., Chida, Y., Takahashi, T., Ohtomo, Y., Sato, K., & Takahashi, K. (1999). Persistent hypoglycemia induced by continuous insulin infusion in broiler chickens. *British Poultry Science*, 40(5), 701–5.
- Amemiya, T. (1983). Glycogen metabolism in the capillary endothelium. Electron histochemical study of glycogen synthetase and phosphorylase in the pecten capillary of the chick. *Acta Histochemica*, 73(1), 93–6.
- Ashby, R., Kozulin, P., Megaw, P., & Morgan, I. (2010). Alterations in ZENK and glucagon RNA transcript expression during increased ocular growth in chickens. *Molecular Vision*, 16(April), 639–49.
- Banks, W., Jaspan, J., & Kastin, A. (1997). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides*, 18(8), 1257–62.
- Bartmann, M., Schaeffel, F., Hagel, G., & Zrenner, E. (1994). Constant light affects retinal dopamine levels and blocks deprivation myopia but not lens-induced refractive errors in chickens. *Visual Neuroscience*, 11(2), 199–208.
- Bear, J. (1991). Epidemiology and genetics of refractive anomalies. *Refractive Anomalies: Research and Clinical Applications*. Boston: Butterworth-Heinemann, 57–80.
- Besharse, J., & Bok, D. (2011). *The Retina and its Disorders* (first edit., p. 910). Academic Press.
- Bitzer, M., & Schaeffel, F. (2002). Defocus-induced changes in ZENK expression in the chicken retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(1), 246–52.
- Boyd, F., Clarke, D., Muther, T., & Raizada, M. (1985). Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 15880–4.
- Buck, C., Schaeffel, F., Simon, P., & Feldkaemper, M. (2004). Effects of positive and negative lens treatment on retinal and choroidal glucagon and glucagon receptor mRNA levels in the chicken. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(2), 402–9.
- Cohen, Y., Belkin, M., Yehezkel, O., Solomon, A., & Polat, U. (2011). Dependency between light intensity and refractive development under light-dark cycles. *Experimental Eye Research*, 92(1), 40–6.
- Cook, R., & Glasscock, R. (1951). Refractive and ocular findings in the newborn. *American Journal of Ophthalmology*, 34(10), 1407–13.
- Cumberland, P., Peckham, C., & Rahi, J. (2007). Inferring myopia over the lifecourse from uncorrected distance visual acuity in childhood. *The British Journal of Ophthalmology*, 91(2), 151–3.
- Cunha-Vaz, J. (1979). The blood-ocular barriers. *Survey of Ophthalmology*, 23(5), 279–96.
- Cunha-Vaz, J. (1997). The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Documenta Ophthalmologica. Advances in Ophthalmology*, 93(1-2), 149–57.
- Cunha-Vaz, J., Shakib, M., & Ashton, N. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *The British Journal of Ophthalmology*, 50(8), 441–53.
- Das, A., Pansky, D., & Dudd, G. (1987). Demonstration of Insulin-Specific mRNA in Cultured Rat Retinal Glial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28(11), 1800–1810.
- Diether, S., & Schaeffel, F. (1997). Local changes in eye growth induced by imposed local refractive error despite active accommodation. *Vision Research*, 37(6), 659–68.
- Duckworth, W., Hamel, F., Liepnieks, J., Frank, B., Yagil, C., & Rabkin, R. (1988). High performance liquid chromatographic analysis of insulin degradation products from a cultured kidney cell line. *Endocrinology*, 123(6), 2701–8.
- Feldkaemper, M., Neacsu, I., & Schaeffel, F. (2009). Insulin acts as a powerful stimulator of axial myopia in chicks. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(1), 13–23.

- Feldkaemper, M., & Schaeffel, F. (2002). Evidence for a potential role of glucagon during eye growth regulation in chicks. *Visual Neuroscience*, 19(6), 755–66.
- Feldkaemper, M., Wang, H., & Schaeffel, F. (2000). Changes in retinal and choroidal gene expression during development of refractive errors in chicks. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(7), 1623–8.
- Fischer, A., Mcguire, J., Schaeffel, F., & Stell, W. (1999). expression of the transcription factor ZENK in the chick retina. *Nature Neuroscience*, 2(8), 706–712.
- Fischer, A., Omar, G., Walton, N., Verrill, T., & Unson, C. (2005). Glucagon-expressing neurons within the retina regulate the proliferation of neural progenitors in the circumferential marginal zone of the avian eye. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(44), 10157–66.
- Foster, P., & Jiang, Y. (2014). Epidemiology of myopia. *Eye (London, England)*.
- Garner, L., Owens, H., Kinnear, R., & Frith, M. (1999). Prevalence of myopia in Sherpa and Tibetan children in Nepal. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 76(5), 282–5.
- Gerhardt, H., Liebner, S., & Wolburg, H. (1996). The pecten oculi of the chicken as a new in vivo model of the blood-brain barrier. *Cell and Tissue Research*, 285(1), 91–100.
- Goldschmidt, E. (1968). *On the etiology of myopia. An epidemiological study. Acta ophthalmologica* (p. Suppl 98:1+).
- Guo, L., Frost, M., He, L., Siegwart, J., & Norton, T. (2013). Gene expression signatures in tree shrew sclera in response to three myopiagenic conditions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(10), 6806–19.
- Gwiazda, J., Thorn, F., Bauer, J., & Held, R. (1993). Myopic children show insufficient accommodative response to blur. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34(3), 690–4.
- Hornbeak, D., & Young, T. (2009). Myopia genetics: a review of current research and emerging trends. *Current Opinion in Ophthalmology*, 20(5), 356–62.
- Hung, L., Crawford, M., & Smith, E. (1995). Spectacle lenses alter eye growth and the refractive status of young monkeys. *Nature Medicine*, 1(8), 761–5.
- Hyndman, A. (1993). Identification of a population of amacrine cells rich in insulin receptors. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 75(2), 289–92.
- Irving, E., Callender, M., & Sivak, J. (1995). Inducing ametropias in hatchling chicks by defocus--aperture effects and cylindrical lenses. *Vision Research*, 35(9), 1165–74.
- Irving, E., Sivak, J., & Callender, M. (1992). Refractive plasticity of the developing chick eye. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 12(4), 448–456.
- Irving, E., Sivak, J., Curry, T., & Callender, M. (1996). Chick eye optics: zero to fourteen days. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 179(2), 185–94.
- Iuvone, P., Tigges, M., Stone, R., Lambert, S., & Laties, A. (1991). Effects of apomorphine, a dopamine receptor agonist, on ocular refraction and axial elongation in a primate model of myopia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(5), 1674–7.
- Jacobsen, N., Jensen, H., Lund-Andersen, H., & Goldschmidt, E. (2008). Is poor glycaemic control in diabetic patients a risk factor of myopia? *Acta Ophthalmologica*, 86(5), 510–4.
- Jones, L., Mitchell, G., Mutti, D., Hayes, J., Moeschberger, M., & Zadnik, K. (2005). Comparison of ocular component growth curves among refractive error groups in children. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(7), 2317–27.
- Jones, L., Sinnott, L., Mutti, D., Mitchell, G., Moeschberger, M., & Zadnik, K. (2007). Parental history of myopia, sports and outdoor activities, and future myopia. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(8), 3524–32.
- Junghans, B., Crewther, S., Liang, H., & Crewther, D. (1999). A role for choroidal lymphatics during recovery from form deprivation myopia? *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 76(11), 796–803.

- Kee, C., Marzani, D., & Wallman, J. (2001). Differences in time course and visual requirements of ocular responses to lenses and diffusers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 42(3), 575–83.
- Kempen, J., Mitchell, P., Lee, K., Tielsch, J., Broman, A., Taylor, H., ... O'Colmain, B. (2004). The prevalence of refractive errors among adults in the United States, Western Europe, and Australia. *Archives of Ophthalmology*, 122(4), 495–505.
- Kumagai, K. (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 15(4), 261–73.
- Lee, K., Klein, B., Klein, R., & Wong, T. (2002). Changes in refraction over 10 years in an adult population: the Beaver Dam Eye study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(8), 2566–71.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., & Roberts, C. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocrine Reviews*, 16(2), 143–63.
- Liang, H., Crewther, S., Crewther, D., & Pirie, B. (1996). Morphology of the recovery from form deprivation myopia in the chick. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology*, 24, 41–44.
- Mayer, D., Hansen, R., Moore, B., Kim, S., & Fulton, A. (2001). Cycloplegic refractions in healthy children aged 1 through 48 months. *Archives of Ophthalmology*, 119(11), 1625–8.
- McBrien, N., Gentle, A., & Cottrill, C. (1999). Optical correction of induced axial myopia in the tree shrew: implications for emmetropization. *Optometry and Vision Science: Official Publication of the American Academy of Optometry*, 76(6), 419–27.
- McCarthy, C., Megaw, P., Devadas, M., & Morgan, I. (2007). Dopaminergic agents affect the ability of brief periods of normal vision to prevent form-deprivation myopia. *Experimental Eye Research*, 84(1), 100–7.
- Menon, R. A., & Sperlin, M. A. (2003). *Pediatric Diabetes* (p. 500). Springer.
- Morgan, I. (2003). The biological basis of myopic refractive error. *Clinical and Experimental Optometry*, 86(5), 276–288.
- Morgan, I., Ohno-Matsui, K., & Saw, S. (2012). Myopia. *Lancet*, 379(9827), 1739–48.
- Moriyama, M., Ohno-Matsui, K., Hayashi, K., Shimada, N., Yoshida, T., Tokoro, T., & Morita, I. (2011). Topographic analyses of shape of eyes with pathologic myopia by high-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging. *Ophthalmology*, 118(8), 1626–37.
- Mutti, D., Mitchell, G., Moeschberger, M., Jones, L., & Zadnik, K. (2002). Parental Myopia, Near Work, School Achievement, and Children's Refractive Error. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(12), 3633–3640.
- Mutti, D., Zadnik, K., Fusaro, R., Friedman, N., Sholtz, R., & Adams, A. (1998). Optical and structural development of the crystalline lens in childhood. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(1), 120–33.
- Nakamura, M., Singh, D., Kubo, E., Chylack, L., & Shinohara, T. (2000). LEDGF: survival of embryonic chick retinal photoreceptor cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(5), 1168–75.
- Napper, G., Brennan, N., Barrington, M., Squires, M., Vessey, G., & Vingrys, A. (1995). The duration of normal visual exposure necessary to prevent form deprivation myopia in chicks. *Vision Research*, 35(9), 1337–44.
- Nickla, D., Wildsoet, C., & Wallman, J. (1997). Compensation for spectacle lenses involves changes in proteoglycan synthesis in both the sclera and choroid. *Current Eye Research*, 16(4), 320–6.
- Norton, T. (1999). Animal Models of Myopia: Learning How Vision Controls the Size of the Eye. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 40(2), 59–77.

- Pan, C., Ramamurthy, D., & Saw, S. (2012). Worldwide prevalence and risk factors for myopia. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 32(1), 3–16.
- Penha, A., Burkhardt, E., Schaeffel, F., & Feldkaemper, M. (2012). Effects of intravitreal insulin and insulin signaling cascade inhibitors on emmetropization in the chick. *Molecular Vision*, 1(October), 2608–22.
- Penha, A., Schaeffel, F., & Feldkaemper, M. (2011). Insulin, insulin-like growth factor-1, insulin receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor expression in the chick eye and their regulation with imposed myopic or hyperopic defocus. *Molecular Vision*, 17(May), 1436–1448.
- Rada, J., McFarland, A., & Cornuet, P. (1992). Proteoglycan synthesis by scleral chondrocytes is modulated by a vision dependent mechanism, *I*(8), 767–782.
- Rada, J., Thoft, R., & Hassell, J. (1991). Increased aggrecan (cartilage proteoglycan) production in the sclera of myopic chicks. *Developmental Biology*, 147(2), 303–312.
- Reiter, C., Sandirasegarane, L., Wolpert, E., Klinger, M., Simpson, I., Barber, A., ... Gardner, T. (2003). Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 285(4), E763–74.
- Rose, K., Morgan, I., Ip, J., Kifley, A., Huynh, S., Smith, W., & Mitchell, P. (2008). Outdoor activity reduces the prevalence of myopia in children. *Ophthalmology*, 115(8), 1279–85.
- Russo, A., Semeraro, F., Romano, M., Mastropasqua, R., Dell'omo, R., & Costagliola, C. (2013). Myopia onset and progression: can it be prevented? *International Ophthalmology*.
- Schaeffel, F. (2002). Das Rätsel der Myopie, 120–141. Retrieved from http://www.eye-tuebingen.de/fileadmin/user_upload/labs/schaeffel/docs/science/schaeffel_myopie.pdf
- Schaeffel, F., Bartmann, M., Hagel, G., & Zrenner, E. (1995). Studies on the role of the retinal dopamine/melatonin system in experimental refractive errors in chickens. *Vision Research*, 35(9), 1247–64.
- Schaeffel, F., & Diether, S. (1999). The growing eye: an autofocus system that works on very poor images. *Vision Research*, 39(9), 1585–9.
- Schaeffel, F., Hagel, G., Bartmann, M., Kohler, K., & Zrenner, E. (1994). 6-Hydroxy dopamine does not affect lens-induced refractive errors but suppresses deprivation myopia. *Vision Research*, 34(2), 143–9.
- Schaeffel, F., & Howland, H. (1988). Accommodation, Refractive Error and Eye Growth in Chickens, *28*(5), 639–657.
- Schaeffel, F., Howland, H., & Farkas, L. (1986). Natural accommodation in the growing chicken. *Vision Research*, 26(12), 1977–1993.
- Schaeffel, F., Troilo, D., Wallman, J., & Howland, H. (1990). Developing eyes that lack accommodation grow to compensate for imposed defocus. *Visual Neuroscience*, 4(2), 177–83.
- Schippert, R., Brand, C., Schaeffel, F., & Feldkaemper, M. (2006). Changes in scleral MMP-2, TIMP-2 and TGFbeta-2 mRNA expression after imposed myopic and hyperopic defocus in chickens. *Experimental Eye Research*, 82(4), 710–9.
- Seko, Y., Tanaka, Y., & Tokoro, T. (1995). Influence of bFGF as a potent growth stimulator and TGF-beta as a growth regulator on scleral chondrocytes and scleral fibroblasts in vitro. *Ophthalmic Research*, 27(3), 144–52.
- Seltner, R., & Stell, W. (1995). The effect of vasoactive intestinal peptide on development of form deprivation myopia in the chick: a pharmacological and immunocytochemical study. *Vision Research*, 35(9), 1265–70.
- Sheng, C., Zhu, X., & Wallman, J. (2013). In vitro effects of insulin and RPE on choroidal and scleral components of eye growth in chicks. *Experimental Eye Research*, 116, 439–48.
- Sherman, S., Norton, T., & Casagrande, V. (1977). Myopia in the lid-sutured tree shrew (*Tupaia glis*). *Brain Research*, 124(1), 154–7.

- Simon, P., Feldkaemper, M., Bitzer, M., Ohngemach, S., & Schaeffel, F. (2004). Early transcriptional changes of retinal and choroidal TGFbeta-2, RALDH-2, and ZENK following imposed positive and negative defocus in chickens. *Molecular Vision*, 10(August), 588–97.
- Sivak, J., Barrie, D., Callender, M., Doughty, M., Seltner, R., & West, J. (1990). Optical causes of experimental myopia. *Ciba Foundation Symposium*, 155, 160–72; discussion 172–7.
- Smith, R. (1971). Ultrastructural studies of the blood-aqueous barrier. I. Transport of an electron-dense tracer in the iris and ciliary body of the mouse. *American Journal of Ophthalmology*, 71(5), 1066–77.
- Smith, R., & Raviola, G. (1983). The Structural Basis of the Blood-Aqueous Barrier in the Chicken Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(3), 326–338.
- Smith, R., & Rudt, L. (1975). Ocular vascular and epithelial barriers to microperoxidase. *Investigative Ophthalmology*, 14(7), 556–60.
- Sonmez, B., Bozkurt, B., Atmaca, A., Irkec, M., Orhan, M., & Aslan, U. (2005). Effect of glycemic control on refractive changes in diabetic patients with hyperglycemia. *Cornea*, 24(5), 531–7.
- Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (Eds.). (1991). *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. New York, NY: Springer New York.
- Stevens, L. (1996). *Avian Biochemistry and Molecular Biology* (p. 228). Cambridge University Press.
- Stone, R., Laties, A., Raviola, E., & Wiesel, T. (1988). Increase in retinal vasoactive intestinal polypeptide after eyelid fusion in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), 257–60.
- Stone, R., Lin, T., Laties, A., & Iuvone, P. (1989). Retinal dopamine and form-deprivation myopia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(2), 704–6.
- Sturkie, P. (1986). *Avian Physiology*. New York: Springer Verlag.
- Takata, K. (1996). Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *Journal of Electron Microscopy*, 45(4), 275–84.
- Taniguchi, C., Emanuelli, B., & Kahn, C. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(2), 85–96.
- Tesoriere, G., Calvaruso, G., Vento, R., Giuliano, M., Lauricella, M., & Carabillò, M. (1994). Insulin synthesis in chick embryo retinas during development. *Neurochemical Research*, 19(7), 821–5.
- Tesoriere, G., Vento, R., Calvaruso, G., Taibi, G., & Giuliano, M. (1992). Identification of insulin in chick embryo retina during development and its inhibitory effect on DNA synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 58(4), 1353–9.
- Törnquist, P., Alm, A., & Bill, A. (1990). Permeability of ocular vessels and transport across the blood-retinal-barrier. *Eye (London, England)*, 4 (Pt 2), 303–9.
- Turner, P., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50(5), 600–13.
- Van Wyk, J., & Smith, E. (1999). Insulin-like growth factors and skeletal growth: possibilities for therapeutic interventions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(12), 4349–54.
- Vessey, K., Rushforth, D., & Stell, W. (2005). Glucagon- and secretin-related peptides differentially alter ocular growth and the development of form-deprivation myopia in chicks. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(11), 3932–42.
- Vitale, S., Sperduto, R., & Ferris, F. (2009). Increased prevalence of myopia in the United States between 1971-1972 and 1999-2004. *Archives of Ophthalmology*, 127(12), 1632–9.

- Waldbillig, R., Pfeffer, B., Schoen, T., Adler, A., Shen-Orr, Z., Scavo, L., ... Chader, G. J. (1991). Evidence for an insulin-like growth factor autocrine-paracrine system in the retinal photoreceptor-pigment epithelial cell complex. *Journal of Neurochemistry*, *57*(5), 1522–33.
- Wallman, J. (1993). Chapter 6 Retinal control of eye growth and refraction. *Progress in Retinal Research*, *12*, 133–153.
- Wallman, J., & Adams, J. (1987). Developmental aspects of experimental myopia in chicks: susceptibility, recovery and relation to emmetropization. *Vision Research*, *27*(7), 1139–63.
- Wallman, J., Turkel, J., & Trachtman, J. (1978). Extreme myopia produced by modest change in early visual experience. *Science (New York, N.Y.)*, *201*(4362), 1249–51.
- Wallman, J., & Winawer, J. (2004). Homeostasis of Eye Growth and the Question of Myopia. *Neuron*, *43*, 447–468.
- Wei, L., Matsumoto, H., & Rhoads, D. (1990). Release of immunoreactive insulin from rat brain synaptosomes under depolarizing conditions. *Journal of Neurochemistry*, *54*(5), 1661–5.
- Wiesel, T., & Raviola, E. (1977). Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys. *Nature*, *266*(5597), 66–8.
- Wildsoet, C. (2003). Neural pathways subserving negative lens-induced emmetropization in chicks--insights from selective lesions of the optic nerve and ciliary nerve. *Current Eye Research*, *27*(6), 371–85.
- Wildsoet, C., & Wallman, J. (1995). Choroidal and scleral mechanisms of compensation for spectacle lenses in chicks. *Vision Research*, *35*(9), 1175–1194.
- Williams, C., & Rizzolo, L. (1997). Remodeling of Junctional Complexes During the Development of the Outer Blood-Retinal Barrier. *The Anatomical Record*, *388*(March), 380–388.
- Winawer, J., & Wallman, J. (2002). Temporal constraints on lens compensation in chicks. *Vision Research*, *42*(24), 2651–68.
- Wojciechowski, R. (2011). Nature and nurture: the complex genetics of myopia and refractive error. *Clinical Genetics*, *79*(4), 301–20.
- Wolfram, C., Höhn, R., Kottler, U., Wild, P., Blettner, M., Bühren, J., ... Mirshahi, A. (2014). Prevalence of refractive errors in the European adult population: the Gutenberg Health Study (GHS). *The British Journal of Ophthalmology*, 1–5.
- Zadnik, K., & Mutti, D. (1987). Refractive error changes in law students. *American Journal of Optometry and Physiological Optics*, *64*(7), 558–61.
- Zadnik, K., Mutti, D., Fusaro, R., & Adams, A. (1995). Longitudinal evidence of crystalline lens thinning in children. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *36*(8), 1581–7.
- Zhu, X., Feldkaemper, M., Fischer, A., & Wallman, J. (2006). Wearing Positive vs. Negative Spectacle Lenses Has Opposite Effects on Glucagon Concentration in the Suprachoroidal Fluid of Chicks. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, (47), E-Abstract 1138.
- Zhu, X., Park, T., Winawer, J., & Wallman, J. (2005). In a matter of minutes, the eye can know which way to grow. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *46*(7), 2238–41.
- Zhu, X., & Wallman, J. (2009). Opposite effects of glucagon and insulin on compensation for spectacle lenses in chicks. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *50*(1), 24–36.

Abbildungsverzeichnis

Nr.		Seite
Abb. 1	Schematische Darstellung des Auges	1
Abb. 2	Zellulärer Aufbau der Netzhaut	3
Abb. 3	Schema der Blut-Augen-Schranke	4
Abb. 4	Zeichnung eines horizontalen Querschnitts durch das Hühnerauge	5
Abb. 5	Weitsichtigkeit	7
Abb. 6	Kurzsichtigkeit	8
Abb. 7	Cordains Theorie zur Entstehung von Kurzsichtigkeit	11
Abb. 8	Anpassung der Augenlänge und Aderhautdicke zur Kompensation von Sammel- und Streulinsen	14
Abb. 9	Schematische Darstellung der Funktionsweise der Infrarot-Photoskioskopie mit Strahlengang	24
Abb. 10	Abbildung auf Monitor des Ultraschallgerätes sowie Kennzeichnung der Peaks für die Hornhaut, Linsenvorderseite, Linsenrückseite und Netzhaut	25
Abb. 11	Darstellung der auf die Versuchstage normierte Refraktionsänderung zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen	39
Abb. 12	Darstellung der auf die Versuchstage normierten Änderung der Achsenlänge zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen	43
Abb. 13	Darstellung des auf die Versuchstage normierten Wachstums der Vorderkammer zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen	47
Abb. 14	Darstellung der auf die Versuchstage normierten Zunahme der Linsendicke zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen	51
Abb. 15	Darstellung der auf die Versuchstage normierten Änderung der Glaskörpertiefe zwischen dem letzten und ersten Versuchstag für alle Versuchsgruppen	54
Abb. 16	Darstellung der auf die Gesamtproteinkonzentration normierte Insulinkonzentration $\times 10^6$ in Aderhaut und Netzhaut zehn Minuten nach intravenöser Saline- bzw. Insulininjektion	59
Abb. 17	Darstellung des Effekts von IP-injiziertem Insulin (zwei Stunden nach Injektion) und Sammellinsenbehandlung auf das Verhältnis von pErk/Erk- und pAkt/Hsp-90 in der Netzhaut	61

Abb. 18	Darstellung des Effekts von IP-injiziertem Insulin (zwei Stunden nach Injektion) und Streulinsenbehandlung auf das Verhältnis von pErk/Erk- und pAkt/Hsp-90 in der Netzhaut	62
Abb. 19	Darstellung des Effekts von systemisch injiziertem Insulin auf die Glukosekonzentration im Glaskörper und Blut (Werte unterhalb der Datenpunkte) zehn Minuten bzw. zwei Stunden nach Injektion in Tieren mit normaler Seherfahrung	64
Abb. 20	Darstellung des Effekts von Insulin auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers in linsenbehandelten Tieren	65

Tabellenverzeichnis

Nr.		Seite
Tabelle 1	Übersicht der Linsenbehandlung und Injektionsart für die Versuchsgruppen	22
Tabelle 2	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel der SDS-Page	34
Tabelle 3	Lösungen SDS-Page & Western-Blot	35
Tabelle 4	Chemikalien SDS-Page & Western-Blot	36
Tabelle 5	Antikörper & Immunkonjugate des Western-Blots	37
Tabelle 6	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse“	41
Tabelle 7	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“	41
Tabelle 8	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Insulininjek- tionen auf die Refraktionsentwicklung der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“	42
Tabelle 9	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Refraktionsänderung der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“	42
Tabelle 10	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IV-Sammel- linse“	45
Tabelle 11	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IP-Sammel- linse“	45
Tabelle 12	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“	46
Tabelle 13	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Achsenlänge der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“	46
Tabelle 14	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IV-Sammel- linse“	48
Tabelle 15	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IP-Sammel- linse“	49

Tabelle 16	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IV-Streu- linse“	49
Tabelle 17	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf das Wachstum der Vorderkammer der Versuchsgruppe „IP-Streu- linse“	50
Tabelle 18	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IV-Sammellinse	52
Tabelle 19	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IP-Sammellinse“	52
Tabelle 20	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“	53
Tabelle 21	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Zunahme der Linsendicke der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“	53
Tabelle 22	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IV-Sammel- linse“	55
Tabelle 23	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IP-Sammel- linse“	56
Tabelle 24	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IV-Streulinse“	56
Tabelle 25	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Injektions- substanz auf die Änderung der Glaskörpertiefe der Versuchsgruppe „IP-Streulinse“	57
Tabelle 26	absolute Refraktion und Längen der Kompartimente des Auges für alle Versuchs- gruppen zu Versuchsende	58
Tabelle 27	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Sammellinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs	61
Tabelle 28	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Sammellinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des PI3K-Signalwegs	62
Tabelle 29	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Streulinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs	63
Tabelle 30	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt von Streulinsenbehandlung und Insulininjektionen auf die Aktivierung des PI3K-Signalwegs	63

Tabelle 31	Ergebnis der 2-way ANOVA für den Effekt der Linsenbehandlung und Insulininjektion auf die Glukosekonzentration des Glaskörpers	66
Tabelle 32	Der Effekt von intravitreal injiziertem & systemisch injiziertem Insulin in Tieren mit normaler Seherfahrung.	73
