

Dissertation

Der Redoxzustand von Albumin im Glaskörper

eingereicht von

**Dr.med.univ.
Christoph Schwab**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizinischen Wissenschaft
Dr. scient. med.**

an der

Medizinischen Universität Graz
ausgeführt an der
Universitätsklinik für Augenheilkunde
und dem
Institut für physiologische Chemie

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat.Karl Öttl

&

O.Univ.Prof.Dr. Andreas Wedrich

&

O.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Gilbert Reibnegger

Jahr der Einreichung 2017

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, abgefasst und jene Personen und Institutionen die am Zustandekommen der Forschungsdaten beteiligt waren, namentlich genannt zu haben. Andere als die angegebenen Quellen habe ich nicht verwendet und die den benutzen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit an der Dissertation und daraus entstandener Publikation wurden gemäß den Regeln der „Good scientific Practice“ durchgeführt.

Teile der Arbeit wurde bereits im Journal „Acta Ophthalmologica“ unter dem Titel Prevalence of posterior vitreous detachment in glaucoma patients and controls veröffentlicht.(1)

Graz am 26.03.2017

Danksagung

Dieses Arbeit ist einer einzigartigen und wundervollen Frau gewidmet. Kathi, du bist immer für unsere Töchter und mich da, es gibt keine Worte mit denen man meine Dankbarkeit dafür ausdrücken könnte. Du bist nicht nur die beste Mutter die ich mir für unsere Töchter vorstellen kann, sondern auch die Liebe meines Lebens.

Zu ganz besonderem Dank verpflichtet bin ich den Betreuern dieser Arbeit denn ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Hr. ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Karl Öttl möchte ich für die vielen Erklärungen, die inspirierenden Diskussionen, Korrekturen und die Finanzierung des Probentransportes danken.

Hr. o. Univ. Prof. Dr. Andreas Wedrich danke ich für die Unterstützung und für die bereitgestellten Ressourcen welche für die Erstellung dieser Dissertation notwendig waren. Weit über diese Arbeit hinausreichend möchte ich mich auch für die Entwicklungschancen und Förderungen bedanken, welche mir zuteil werden.

Hr. o. Univ. Prof. Mag. Dr. Gilbert Reibnegger danke ich neben der Bereitschaft Ressourcen für dieses Projekt bereitzustellen ganz besonders für das Geleit durch den Statistik Dschungel.

Frau Doris Payerl danke ich für die gute Zusammenarbeit, Analyse der Proben und der Unterstützung im Labor bei der Durchführung der Experimente.

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeines zum Glaskörper.....	12
1.1	Veränderungen des Glaskörpers während des Lebens	14
1.1.1	Embryologie	14
1.1.2	Postnatal	14
1.1.3	Die Gelkonsistenz des Glaskörpers, Ascorbinsäure und der Sauerstoffabbau.....	15
2	Reaktive Sauerstoffspezies, Antioxidantien und oxidativer Stress	17
2.1	Vitamin C, Ascorbinsäure	19
2.1.1	Vitamin C und das erste klinische kontrollierte Experiment.....	20
2.1.2	Vitamin C im Auge.....	21
2.2	Albumin	22
2.2.1	Albumin: Bindungskapazitätsabhängige Rolle als Antioxidans.....	22
2.2.2	Albumin: Ein Radikalfänger	22
2.3	Das Zusammenspiel reaktiver Sauerstoffspezies und Antioxidantien	24
2.3.1	Die Dosis macht das Gift	24
3	Messung von oxidativem Stress im Glaskörper	27
4	Zielsetzung dieser Arbeit	28
5	Oxidativer Stress im Glaskörperraum.....	29
5.1	PatientInnen und Methoden.....	29
5.1.1	Statistische Auswertung.....	34
5.2	Ergebnisse	35
5.2.1	Allgemeine Beschreibung der Daten	35
5.2.2	Albuminkonzentration.....	36
5.2.3	Albuminfraktionen in Plasma und GK.....	37
5.2.4	Gruppenvergleiche	38
5.2.5	Ascorbinsäure im Glaskörper	62
5.3	Diskussion	69
5.4	Experimente	84

Oxidativer Stress im Glaskörper

5.4.2	Experiment 1: Oxidationsverhalten des GK Pools bei einer Inkubationstemperatur von 37°	84
5.4.3	Experiment 2: Zusatz eines Chelatbildners.....	87
5.4.4	Experiment 3: GK Filtration	89
5.4.5	Ergebnisse.....	91
5.4.6	Experiment 4: Kontrollexperiment.....	93
5.5	Klinische Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf den Glaskörper am Beispiel Glaukom	95
5.5.1	Einleitung	95
5.5.2	Methode	96
5.5.3	Ergebnisse.....	101
5.5.4	Diskussion und Interpretation der Ergebnisse	103
6	Ausgewählte Zusammenhänge	105
7	Literaturverzeichnis	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Ausschlussgründe	35
Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Albuminkonzentrationen	36
Tabelle 3: Die relativen Albuminfraktionen aus dem Plasma.....	37
Tabelle 4: Die relativen Albuminfraktionen aus dem GK.....	37
Tabelle 5: Stratifizierung der GK in 6 Gruppen: PatientInnen Anzahl.....	38
Tabelle 6: Aufschlüsselung der Gruppen nach eingeschlossenen Diagnosen.....	38
Tabelle 7: Albuminkonzentration des GK unter Berücksichtigung der Indikation für die Vitrektomie.....	39
Tabelle 8: Diagnosen in der Kontrollgruppe.....	40
Tabelle 9: Aufschlüsselung der Albuminfraktionen der Kontrollgruppe aus Plasma und GK.....	40
Tabelle 10: Albuminfraktionen des Glaskörpers aus der Kontrollgruppe tabellarisch aufgelistet nach Diagnose	42
Tabelle 11: Albuminfraktionen des Plasmas aufgeschlüsselt nach Diagnose.....	44
Tabelle 12: Verteilung des Alters in der Kontrollgruppe.....	44
Tabelle 13: Korrelationen der Albuminfraktionen aus Plasma und GK mit dem Alter	45
Tabelle 14: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt nach Glaskörperstatus	47
Tabelle 15: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem GK zu Pseudophakie- und Kontrollgruppe	47
Tabelle 16: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem Plasma zu Pseudophakie- und Kontrollgruppe	48
Tabelle 17: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem GK zu Glaukom- und Kontrollgruppe	51
Tabelle 18: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem Plasma zu Glaukom- und Kontrollgruppe	51
Tabelle 19: Aufschlüsselung der Diagnosen der „Diabetesgruppe“; Alle PatientInnen mit einer GK Blutung wiesen eine proliferative diabetische Retinopathie auf.....	53
Tabelle 20: Relativen Albuminfraktionen aus dem Glaskörper für die Kontroll- und die Diabetesgruppe.....	54
Tabelle 21: Aufschlüsselung der Diagnosen innerhalb der Diabetesgruppe	54

Oxidativer Stress im Glaskörper

Tabelle 22: Tabellarische Aufschlüsselung der verschiedenen Albuminfraktion innerhalb der Diabetesgruppe unter Berücksichtigung der Operationsindikation.	55
Tabelle 23: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt nach Diabetesstatus	56
Tabelle 24: Gegenüberstellung der Albuminfraktionen aus GK und Plasma von Diabetes Patienten	57
Tabelle 25: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio	58
Tabelle 26: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio	58
Tabelle 27: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung	60
Tabelle 28: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung	61
Tabelle 29: Ascorbinsäure Konzentrationen im Glaskörper	62
Tabelle 30: ASC Konzentrationen unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung..	63
Tabelle 31: Plasma- und Glaskörper Albumin-, sowie Ascorbinsäure (ASC) Konzentration.....	65
Tabelle 32: Glaskörper (GK) and Plasma Albumin Fraktionen (humanes mercaptalbumin, HMA; human non-mercaptalbumin-1; HNA1; human non-mercaptalbumin-2, HNA2)	65
Tabelle 33: : Korrelationen Zwischen Ascorbinsäure (ASC) Konzentration und Albuminfraktionen	66
Tabelle 34: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C.....	85
Tabelle 35: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C nach Beimengung eines Chelatbilders.....	88
Tabelle 36: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit on der Inkubationszeit des Überstandes	90
Tabelle 37: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Filtrates.....	92
Tabelle 38: Albumin 4 Stunden lang inkubiert: relative Werte der verschiedenen Albuminfraktionen	93
Tabelle 39: Demographische Daten der eingeschlossenen PatientInnen	101
Tabelle 40: Glaukomspezifische Indikatoren der GlaukompatientInnen.....	101

Oxidativer Stress im Glaskörper

Abbildung 1: Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂): Mögliche Reaktionswege und deren Produkte; chemische Bezeichnungen: OH· Hydroxylradikal; OH ⁻ Hydroxidation; H ₂ O Wasser; O ₂ Sauerstoff; GSH Glutathion (reduzierte Form); GSSG Glutathiondimer (oxidierte Form)	17
Abbildung 2: Ascorbinsäure (AscH ₂) kann sukzessiv Elektronen und Protonen abgeben. Endprodukt dieser Reaktion ist die Dehydroascorbinäure (DHA)	20
Abbildung 3: Links Albuminmolekül - hervorgehoben ist der freie Thiolrest des Cystein 34; Rechts ein Chromatogramm, die peaks sind entsprechenden der jeweiligen Albuminfraktionen markiert: humanes mercaptalbumin, HMA; human non-mercaptalbumin-1; HNA1; human non-mercaptalbumin-2, HNA2	23
Abbildung 4: Wasserstoffperoxid: Entstehungswege, mögliche enzymatische Abbauewege bzw. deren Produkte sowie potentiell entstehende Radikale. Chemische Bezeichnungen: OH· Hydroxylradikal; OH ⁻ Hydroxidation; H ₂ O ₂ Wasser; O ₂ Sauerstoff; GSH Glutathion (reduzierte Form); GSSG Glutathiondimer (oxidierte Form)	26
Abbildung 5: Graphische Darstellung der absoluten und relativen Werte der Indikationen für die Vitrektomien	36
Abbildung 6: Albuminkonzentration des GK unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung (MW-BLK: Mittelwert-blank)	39
Abbildung 7: Albuminfraktionen des Glaskörpers graphisch aufgeschlüsselt nach Diagnose	41
Abbildung 8: Albuminfraktionen des Plasmas aufgeschlüsselt nach Diagnose	43
Abbildung 9: Albuminfraktionen des Glaskörpers mit Berücksichtigung des Glaskörperstatus	46
Abbildung 10: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung des Linsenstatus.....	49
Abbildung 11: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung des Linsenstatus	49
Abbildung 12: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose „Glaukom“	52
Abbildung 13: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose „Glaukom“	52
Abbildung 14: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt nach Diabetes Status	53

Abbildung 15: Graphische Darstellung der verschiedenen Albuminfraktionen unter Berücksichtigung der Indikation für die Vitrektomie (alle GK Blutungen sind proliferative diabetische Retinopathien)	55
Abbildung 16: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt nach Diabetesstatus	56
Abbildung 17: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio	59
Abbildung 18: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio	60
Abbildung 19: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung	61
Abbildung 20: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung	62
Abbildung 21: ASC Konzentrationen als Boxplot unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung	63
Abbildung 22: Zusammenhang Albumin und Ascorbinsäure Konzentration	64
Abbildung 23: Glaskörper (GK) und Plasma Albumin Fraktionen dargestellt anhand eines box blots	65
Abbildung 24: Korrelation zwischen GK - human mercaptalbumin (Vitreous HMA) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)	67
Abbildung 25: Korrelation zwischen GK - non human mercaptalbumin1 (Vitreous HNA1) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)	67
Abbildung 26: Korrelation zwischen GK - non human mercaptalbumin2 (Vitreous HNA2) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)	68
Abbildung 27: Vergleich der beiden enzymatischen H ₂ O ₂ Abbauwege durch die Katalase und die Glutathionperoxidase	81
Abbildung 28: Model der GS-SG Entstehung bzw. Reaktion von HMA zu HNA1. Die Bildung von Glutathiondisulfid erscheint vor allem auf 2 Entstehungswege zurückzuführen zu sein: Zum einen aus dem enzymatischem Abbau von H ₂ O ₂ und zum anderen über die nicht enzymatische Reduktion von Dehydro ASC. GS-SG steht in einem dynamischen Austausch mit anderen Thiolgruppen wie HMA unter Bildung von HNA1.	82
Abbildung 29: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen in Abhängigkeit der Inkubationszeiten	86

Oxidativer Stress im Glaskörper

Abbildung 30: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C nach Beimengung eines Chelatbildners.	88
Abbildung 31: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen im Überstand in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C.....	91
Abbildung 32: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen im Filtrat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	92
Abbildung 33: Albumin 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert: graphische Darstellung der zeitlichen Änderung der relativen Albuminfraktionen.....	94
Abbildung 34: Untersuchungs- Entscheidungsbaum (OCT: optische Kohärenz Tomographie, US: Ultraschall).....	97
Abbildung 35: GK Befunde:.....	99
Abbildung 36: Relative Häufigkeiten der verschiedenen GK Stadien	102

Abkürzungen und deren Erklärungen

GK	Glaskörper
ASC	Ascorbinsäure (synonym Vitamin C)
HGA	Hintere Glaskörperabhebung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie
ILM	Innere limitierende Membran
ErM	Epiretinale Membran
FR	Freie Radikale
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RNS	reaktive Stickstoff Spezies
US	Ultraschall
OR	odds ratio
CI	confidence interval
HMA	Mercaptalbumin
HNA1	Nonmercaptalbumin 1
HNA2	Nonmercaptalbumin 2
MW±SA	Mittelwert±Standard

Zusammenfassung

Der Glaskörper ist ein einzigartiges Gewebe mit einzigartigen Eigenschaften und Stoffwechselfvorgängen. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist das Zusammenspiel des GK mit verschiedenen Erkrankungen in Hinblick auf das Vorkommen reaktive Sauerstoffspezies. Die Arbeit ist in 3 Teile gegliedert, in welchen die Thematik aus analytischer, experimenteller und klinischer Sicht beleuchtet wird. Die wichtigste Konklusion diese Studie ist, dass Ascorbinsäure im Glaskörper prooxidative Eigenschaften besitzt und dass bei Glaukoma Patienten im Glaskörper vermehrt reaktive Sauerstoffspezies vorherrschen welche zu einer Glaskörperabhebung führen können.

Abstract

The vitreous is a unique tissue with unique physiologic functions and metabolism. This thesis thereby focuses on vitreous reactive oxygen species in relation to different diseases. The manuscript is segmented into 3 parts investigating the subject from an analytic, an experimental and a clinical point of view. Main conclusions from this study is vitreous ascorbic acid acts as a prooxidans and that glaucoma patients exhibit higher levels of reactive oxygen species in the vitreous leading to premature posterior vitreous detachment.

Einleitung

1 Allgemeines zum Glaskörper

Der Glaskörper (GK) ist eine gelartige, gefäßfreie Struktur, welche sich zwischen der Linse, dem Aufhängeapparat der Linse und der Netzhaut befindet. (2) Diesem werden zahlreiche physiologische Funktionen zugeschrieben: (3-5)

- Eine regulierende Funktion auf das Augenwachstum in der Embryogenese
- Eine optische Medientransparenz, welche durch die einzigartige chemische Zusammensetzung des GK gewährleistet wird.
- Eine Barrierefunktion, welche das Eindringen von Makromolekülen und Zellen in den GK Raum verhindert, um die Medientransparenz zu bewahren.
- Eine mechanisch stabilisierende Funktion des Bulbus (z.B.: die Verhinderung des Kollapses bei perforierenden Augenverletzungen) und der Netzhaut (vor allem bei Augenbewegungen)
- Speicher für Stoffwechselprodukte wie Glucose, Lactat, Aminosäuren oder Vitamin C

Der GK besteht zum größten Teil aus Wasser – nämlich zu ca. 98 - 99 %. Weitere Bestandteile sind die Makromoleküle Hyaluronsäure (ca. 2 %) und Kollagen (<<1 % Typ II, V und IX), welche miteinander interagieren und so ein dreidimensionales Fasernetzwerk bilden, welches dem GK Stabilität verleiht. Die Assoziation von Hyaluronsäure in diesem weitmaschigen Netzwerk sowie deren hohe Kapazität, Wasser zu binden, bedingen die homogene Konsistenz des Glaskörpers und seine Transparenz. (6-11)

Erwähnenswert dabei ist, dass die Verteilung des Kollagens nicht homogen ist: Die höchste Kollagendichte findet sich im Bereich der GK Basis und am hinteren Kortex – an diesen Stellen ist der GK besonders fest mit der Netzhaut verbunden. Diese Verbindung besteht aus Ankerfibrillen zwischen GK Kortex und der inneren limitierenden Membran (ILM) der Netzhaut. (12,13)

Oxidativer Stress im Glaskörper

Nicht nur die Interaktion von Hyaluronsäure und Kollagen bzw. die hohe Wasserkonzentration, sondern auch die Verteilung von Proteinen machen den GK zu einem einzigartigen Gewebe. Die Konzentration der GK Proteine macht nur 1-3% jener des Serums aus. Vorherrschend sind hierbei: Albumin (293 +/- 18 mg/l), Transferrin (73.7 +/- 6.6 mg/l), Immunglobulin G, (33.5 +/- 3 mg/l), alpha 1-antitrypsin (14.1 +/- 2.9 mg/l) und alpha 1-saures Glykoprotein (4 +/- 0.7 mg/l). (14-17)

Einzigartig ist auch die Konzentrationen der niedermolekularen Stoffe, allen voran ist hierbei die Ascorbinsäure (= Vitamin C, ASC) Konzentration (0,4mmol/kg) zu erwähnen – diese übertrifft die Konzentration im Blut um das 10fache. ASC wird aktiv, d.h. unter Aufwendung von Energie über den Ziliarkörper in das Auge sezerniert. (3,18) Warum gerade im Glaskörper eine so hohe ASC Konzentration wichtig ist, wird klar wenn man sich die physiologischen Funktionen von ASC vor Augen hält:

- ASC ist ein Coenzym der Prolyl-4-Hydroxylase; Dieses Enzym ist wichtig für die Biosynthese von Kollagen. Es katalysiert die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin und ist daher für den Kollagenaufbau unerlässlich(19,20)
- Die Lysylhydroxylase katalysiert zusammen mit ASC die Hydroxylierung von L-Lysin zum Hydroxylysin; letzteres ist wichtig für die kovalente Quervernetzung benachbarter Kollagenmoleküle(19,20)
- ASC wirkt als Radikalfänger im wässrigen Milieu und wirkt so der Entstehung von oxidativem Stress entgegen(18-20)
- ASC senkt den Sauerstoffpartialdruck im GK, indem es O_2 zu H_2O_2 umwandelt. Aus letzterem können äußerst reaktive Hydroxylradikale gebildet werden(5,21,22)

An dieser Stelle sei besonders hervorgehoben, dass ASC im GK sowohl als Anti- als auch als Prooxidans (im Rahmen des Sauerstoffabbaus) wirken kann.

1.1 Veränderungen des Glaskörpers während des Lebens

1.1.1 Embryologie

Der GK durchläuft altersbedingte Veränderungen wie kaum ein anderes Gewebe. Während der Embryogenese ist dieser von einem dichten Gefäßnetz durchzogen. Diese sogenannten hyoidalen Gefäße sind im zweiten Fetalmonat am dichtesten ausgeprägt. Zusammen mit der Extrazellulärmatrix bildet dieses Gefäßnetzwerk den sogenannten primären GK. In weiterer Folge bilden sich diese Gefäße zurück, sodass normaler Weise um den siebten Fetalmonat kein Blutfluss mehr in diesen Gefäßen zu detektieren ist. In weiterer Folge wandelt sich der GK von einer flüssigen in eine gelartige Konsistenz um. (8,9,11,23)

1.1.2 Postnatal

Während des Längenwachstums des Auges nimmt auch der Glaskörper an Volumen zu, sodass er im Erwachsenenalter durchschnittlich 4 mL einnimmt.

Der „jugendliche“ Glaskörper ist homogen gelförmig. Mit zunehmendem Alter passiert jedoch durch die Depolymerisation von Hyaluronsäure eine Verflüssigung dieses Gels, und der GK verliert seine visköse Eigenschaft. Durch kleine Lücken in der GK Grenzmembran kann verflüssigter GK in die präretinale Region übertreten – dies induziert eine hintere GK Abhebung (HGA). Dabei kommt es zu einer Trennung der Glaskörper-Grenzmembran von der ILM. Dieser physiologische Prozess beginnt zuerst in der perimakulären Region, bevor sich der GK von der zentralen Makula abzuheben beginnt und sich zuletzt von der Papille trennt. (3,10,23-25)

Der größte Risikofaktor für eine HGA ist ein höheres Lebensalter – im Alter von über 75 Jahren haben über 85% aller Menschen einen abgehobenen GK. (25) Beim Alterungsprozess spielen neben vielen anderen Faktoren auch freie Radikale eine wichtige Rolle – und tatsächlich haben Experimente gezeigt, dass sich der GK unter dem Einfluss freier Radikale verflüssigt. (7,10,23,24,26)

1.1.3 Die Gelkonsistenz des Glaskörpers, Ascorbinsäure und der Sauerstoffabbau

Die gelartige Konsistenz des GK scheint für die physiologischen Funktionen des GK von ganz besonderer Bedeutung zu sein.

Hier soll beispielhaft das Stickler Syndrom kurz angeführt werden. Diese ist vermutlich das häufigste Syndrom in den Vereinigten Staaten und in Europa – jedoch wird es nur sehr selten diagnostiziert, da die meisten Erkrankten kaum Symptome aufweisen.

Schätzungen gehen davon aus, dass auf ca. 7500–9000 Geburten rund eine Erkrankung kommt. (27) Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine Kollagenopathie, bei der – je nach Ausprägungstyp - durch eine gestörte Kollagensynthese die Gelkonsistenz des GK verloren geht – der GK Raum erscheint in der ophthalmologischen Untersuchung als „optisch leer“. (3,28) Der GK kann in ausgeprägten Fällen seinen physiologischen Funktionen (siehe oben) gar nicht mehr nachkommen. Die schwersten Folgen bei diesen Patienten sind:

- Eine ausgeprägte Myopie sowie Netzhautablösungen als Folge der fehlenden stabilisierenden Funktion des GK
- Eine frühe Kataraktentwicklung und Glaukomentwicklung vermutlich wegen eines zu hohen Sauerstoffpartialdruckes im Auge.

Mit Ausnahme der Myopie und eingeschränkt von Netzhautablösungen sind ähnliche Symptome nach einer operativen GK Entfernung (Vitrektomie) – bei welcher der gelförmige GK entfernt wird und das Auge stattdessen mit einer Flüssigkeit wie z.B.: Ringer Laktat Lösung gefüllt wird - zu erwarten: Sowohl eine erhöhte Glaukomprävalenz (durch erhöhten Augendruck bedingt) als auch eine erhöhte Kataraktogenese (insbesondere eine nukleäre Linsentrübung) sind in der rezenten Literatur beschrieben. (27-29)

Darüber hinaus wurde eine enge Beziehung zwischen der Gelkonsistenz des GK und ASC Konzentration im Auge beschrieben – je höher die Viskosität des GK, desto höher ist die ASC Konzentration. Verflüssigt sich der GK beispielsweise altersbedingt oder wird dieser operativ durch eine Flüssigkeit ersetzt sind nur mehr niedrige ASC Konzentration nachzuweisen.(3,17,23) Anzumerken ist jedoch, dass aus diesen Daten keine Kausalitäten hervorgehen: Ob die ASC Konzentration sinkt, weil sich der GK verflüssigt oder ob sich der GK verflüssigt, weil die ASC Konzentration sinkt, bleibt ungeklärt.

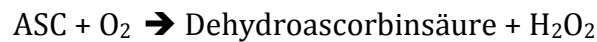
Oxidativer Stress im Glaskörper

Wie bereits beschrieben ist ASC - neben einigen anderen Aufgaben - für einen suffizienten Sauerstoffabbau im GK notwendig.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass bei vitrektomierten Augen (in vivo) signifikant erhöhte Sauerstoffpartialdrücke im GK Raum und in der Vorderkammer des Auges nachgewiesen werden konnten. (4,5,21,30,31) Des Weiteren konnte in ex vivo Experimenten eine deutliche Beziehung zwischen Viskosität des GK, ASC Konzentration und dem Sauerstoffabbau hergestellt werden. (9,22) Die erhöhte Sauerstoffkonzentration bzw. der daraus potentiell entstehende oxidative Stress wird in der Literatur für die Katarakt- und Glaukomentwicklung als Ursache diskutiert. (4,5,21,22,32,33)

2 Reaktive Sauerstoffspezies, Antioxidantien und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zeichnen sich durch Ihre Fähigkeit aus andere Atome/Moleküle zu oxidieren. Zu der Gruppe der ROS zählen einerseits stabile molekulare Oxidantien (z.B. Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff oder Ozon) und andererseits oftmals die sehr reaktionsfreudigen freien Radikale. Beim Abbau von Sauerstoff über ASC kommt es zur Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2):



In Abhängigkeit vom Reaktionspartner kann H_2O_2 zu weiteren Produkten - teils unschädlichen und teils zu solchen mit sogar noch stärker oxidierender Potenz als H_2O_2 - degradiert werden (Abbildung 1).

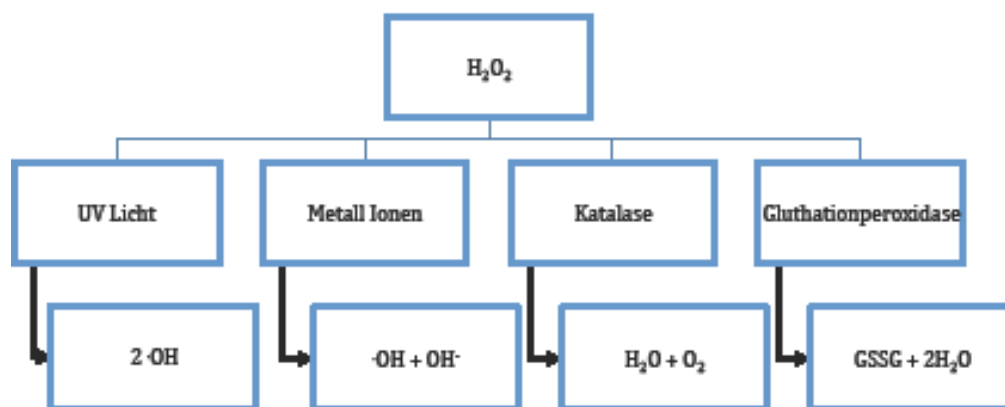


Abbildung 1: Wasserstoffperoxid (H_2O_2): Mögliche Reaktionswege und deren Produkte; chemische

Bezeichnungen: OH^\cdot Hydroxylradikal; OH^- Hydroxidion; H_2O Wasser; O_2 Sauerstoff; GSH Glutathion (reduzierte Form); GSSG Glutathiondimer (oxidierte Form)

Ein Oxidans ist ein Stoff, welcher andere Stoffe oxidieren kann und dabei selber reduziert wird. Oxidantien können Elektronen aufnehmen und werden deshalb als Elektronenakzeptoren bezeichnet.

Als freie Radikale (FR) werden Atome oder Moleküle bezeichnet, welche (mindestens) ein ungepaartes Außenelektron (Valenzelektron – symbolisch dargestellt als \cdot) besitzen.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Diese FR reagieren oft stark exergonisch, sodass sie aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit nur sehr kurzlebig sind. Die Entstehung solcher FR in biologischen Systemen kann sowohl endogene (z.B.: im Rahmen des Stoffwechsels) als auch exogene Ursachen (z.B.: ionisierende Strahlung) haben. Sie können beispielsweise durch eine chemische Spaltung einer kovalenten Bindung entstehen, wenn jeweils ein Elektron einer - vormals bestehenden - Elektronenpaarbindung bei je einem Spaltprodukt verbleibt.

Die Hauptquelle der ROS ist in der Atmungskette (welche im inneren der Mitochondrien stattfindet) zu finden. Im Rahmen der Atmungskette dient molekularer Sauerstoff als Oxidationsmittel – Sauerstoff wird über mehrere Zwischenstufen reduziert, sodass schlussendlich Wasser entsteht. Dabei werden 4 Elektronen und 4 Wasserstoffionen stufenweise über Proteinkomplexe auf Sauerstoff übertragen, wobei Energie in Form von Adenosintriphosphat gewonnen wird (man nennt diesen Prozess oxidative Phosphorylierung).

Bei der partiellen Reduktion von Sauerstoff kommt es zur Bildung von Superoxidradikalen (man schätzt, dass etwa 1-3% des in den Mitochondrien anfallenden Sauerstoffs zu Superoxidradikalen umgewandelt werden), welche durch die Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) abgebaut werden. (29,30) H_2O_2 ist relativ stabil und kann durch die Mitochondrienmembran ungehindert in das Zytoplasma passieren. In der Anwesenheit von Metallionen können Wasserstoffperoxid-Moleküle zu hoch reaktionsfreudigen Hydroxylradikalen bzw. zu Hydroxidationen weiter reagieren (= Fenton Reaktion). Die ROS, welche im Rahmen der Atmungskette entstehen, sind sozusagen ein unerwünschtes Nebenprodukt. Da das Auftreten von freien Radikalen seit 1956 durch den Biogerontologen Denham Harman im Rahmen seiner „Theorie der freien Radikale“ mit Erkrankungen und ganz allgemein mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht wird, haben diese Moleküle vor allem in der Populärmedizin einen schlechten Ruf erlangt. (34-38)

Es sei jedoch an dieser Stelle auch hervorgehoben, dass ROS ebenfalls physiologischer Weise erzeugt werden bzw. wichtige Aufgaben erfüllen.

Radikalische Sauerstoffionen (O_2^-) beispielsweise werden bei der Phagozytose und Lyse von Bakterien in Granulozyten aktiv durch die NADPH-Oxidase in der Lysozym-Membran erzeugt. (39)

Als wichtiges Signalmolekül wirkt Stickstoffmonoxid (NO^*) bei der Gefäßregulation (im Sinne einer Vasodilatation – wie beispielsweise bei der Erektion) oder aber bei der Einleitung der Apoptose. (19,40,41)

Aber auch dem bereits angesprochenen H_2O_2 wird in rezenter Literatur als Signalmolekül eine wichtige physiologische Funktion zugeschrieben (=Redoxregulation). Im Detail soll diese ROS bei der synaptischen Plastizität und bei der Gedächtnisbildung beteiligt sein. (42)

Der Grund für den schlechten Ruf der ROS und ihrer Rolle beim Alterungsprozess bzw. bei Erkrankungen ist ihre hohe Reaktionsfreudigkeit - dadurch können Makromoleküle wie z.B.: Lipide, Proteine, RNA- oder gar DNA-Moleküle beschädigt werden. Um dem entgegen zu wirken, besitzt der Körper einige sehr potente Mechanismen, um die Entstehung von ROS bzw. die Beschädigung relevanter Moleküle zu verhindern. Zu diesen Mechanismen zählen sowohl Enzyme als auch sogenannte Radikalfänger. Als Beispiel für ein solches Enzym sei hier die Katalase erwähnt: Diese baut H_2O_2 zu H_2O ab, bevor es andere Moleküle oxidiert.

2.1 Vitamin C, Ascorbinsäure

Als Beispiel für einen Radikalfänger soll Vitamin C (Ascorbinsäure, ASC) – welches bei dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist - besprochen werden. ASC ist ein Kohlenhydrat, welches durch Oxidation der L-Gulose am Carbonyl-C Atom entsteht. ASC weist einen pK_s Wert von 4,25 auf und liegt daher unter physiologischen Bedingungen als Ascorbatanion (AsCH_2) vor. In wässriger Form stellt ASC ein starkes Reduktionsmittel dar, welches über Zwischenstufen – über die sukzessive Abgabe von Elektronen und Protonen – zu seiner oxidierten Form der Dehydroascorbinsäure umgewandelt wird (Siehe Abbildung 2). (19,20)

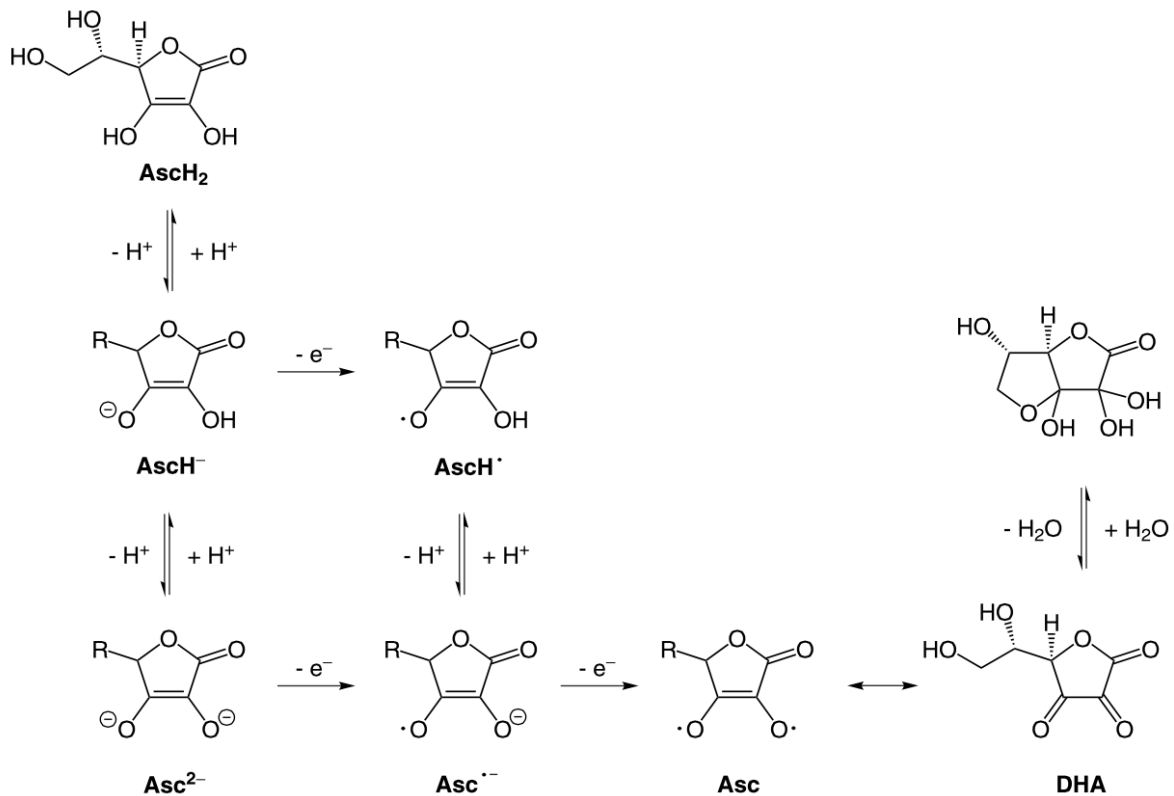


Abbildung 2: Ascorbinsäure (AsCH₂) kann sukzessiv Elektronen und Protonen abgeben. Endprodukt dieser Reaktion ist die Dehydroascorbinäure (DHA) ⁱ

Die meisten Lebewesen – mit Ausnahme von Primaten und Meerschweinchen – sind in der Lage, ASC aus Glukuronsäure selber herzustellen. Vitamin C ist daher für den Menschen (und Meerschweinchen) ein klassisches Vitamin. Der Tagesbedarf an ASC wird für den Menschen mit 100mg angegeben.

2.1.1 Vitamin C und das erste klinische kontrollierte Experiment

Der Name Ascorbinsäure (Anti – Skorbutsäurevitamin) ist ein Kunstwort, welches einerseits den Vitamincharakter dieses Moleküls betont und andererseits auf dessen Mangelerkrankung – nämlich die Erkrankung Skorbut hindeutet. Skorbut wurde bereits im alten Ägypten (2. Jahrtausend vor Christus) beschrieben, auch der griechische Arzt Hippokrates berichtete über diese Erkrankung.

Bis in das 18. Jahrhundert galt Skorbut als gefürchtete Erkrankung unter Matrosen, da diese Erkrankung die häufigste Todesursache auf See war. Skorbut manifestiert sich besonders in Geweben mit hohem Kollagenumsatz wie Blutgefäßen, Knochen, Knorpel und Bindegewebe. Es kommt im Verlauf dieser Erkrankung zu Haut- und Schleimhauteinblutungen, subperiostalen Blutungen, Zahnfleischentzündungen, einer

Wundheilungsstörung und schlussendlich zu einem Immundefizit mit erhöhter Infektanfälligkeit. (19,20,43)

Lange Zeit galt Skorbut als „mysteriöse“ Matrosenerkrankung – Vitamine waren bis dahin noch nicht bekannt. James Lind (geb. am 4.10.1716 in Edinburgh, gestorben am 13.7.1794), ein schottischer Arzt, beschäftigte sich intensiv mit dieser Erkrankung. Er leistete wichtige Beiträge zur Bordhygiene und konnte die Therapie von Skorbut mit Zitronensaft anhand des ersten dokumentierten klinischen Experimentes beweisen. Hierzu teilte er 12 skorbutkranke Matrosen in 6 Gruppen zu je 2 Personen ein: Die erste Gruppe erhielt knapp einen Liter Apfelwein täglich, die zweite Gruppe nahm 25 Tropfen Schwefelsäure ein, die dritte Gruppe sechs Löffel Essig, die vierte einen $\frac{1}{4}$ Liter Seewasser, die fünfte Gruppe zwei Orangen und eine Zitrone und die letzte Gruppe eine Gewürzpaste und Gerstenwasser. Die fünfte Gruppe und in geringen Maße auch die erste erfuhren innerhalb von 6 Tagen eine Verbesserung der Erkrankung. Dieses erste kontrollierte klinische Experiment wurde 1753 unter dem Titel „A Treatise of the scurvey“ veröffentlicht. (43-47)

2.1.2 Vitamin C im Auge

Anhand der Erkrankung Skorbut kann man erkennen, welche vielfältigen und wichtigen Aufgaben ASC inne hat. Interessant ist, dass man im Plasma eine ASC Konzentration von 0,04mmol/kg, im GK 0,4mmol/kg und im Kammerwasser sogar 1,4mmol/kg findet. ASC wird aktiv – das heißt unter Aufwendung von Energie, über den Ziliarkörper in das Auge sezerniert. Da die Natur Energie aufwendet, um eine hohe ASC Konzentration im Auge zu erreichen, scheint es naheliegend, dass ASC eben dort wichtige Aufgaben hat. Obwohl die hohen ASC Konzentrationen des Auges schon lange bekannt sind und man über die Wichtigkeit von Vitamin C im Körper sogar noch länger Bescheid weiß, wurde der ASC des Auges lange nur relativ wenig Beachtung geschenkt. Abgesehen von einer antioxidativen Funktion wurde ASC im Auge lange keine weitere Funktion zugeschrieben. Erst vor kurzem wurde bekannt, dass ASC maßgeblich an der Regulierung bzw. genauer an der Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes im Auge beteiligt ist. Demnach reagiert ASC mit Sauerstoff zu Dehydroascorbinsäure und Wasserstoffperoxid. Somit wurde erstmals klar, dass ASC im Auge nicht nur antioxidative, sondern sogar prooxidative Eigenschaften besitzt. (4,5,12,21,22,30)

2.2 Albumin

Albumin ist ein Protein, welches in der Leber synthetisiert wird, aus 585 Aminosäuren besteht und 66kDa wiegt. (19,20) Die normale Konzentration von Albumin im Blut beträgt 35 bis 50g/L bzw. 275-311mg/L im GK. (14,17-20) Neben seiner Aufgabe als Transportmolekül (für Fettsäuren, Metalle, Cholesterin, Medikamentwirkstoffen etc.) und Regulator des osmotischen Druckes stellt Albumin ein wichtiges Antioxidans im Blut dar. (14,17-20) Albumin wirkt auf 2 verschiedene Wege als Antioxidans, zum einen über Bindungskapazität und zum anderen als Radikalfänger. (48-52)

2.2.1 Albumin: Bindungskapazitätsabhängige Rolle als Antioxidans

Albumin nimmt eine wichtige antioxidative Rolle ein, indem es Übergangsmetalle wie Kupfer- oder Eisenionen bindet. Freie Metallionen wie zweiwertige Eisen- oder Kupferionen (Fe II oder Cu II) sind in Anwesenheit von Sauerstoff und Vitamin C über die Fentonreaktion sehr potente Radikalbildner (siehe Abbildung 4). (53,54) Durch die Bindung dieser Ionen an Albumin werden freie Metallionen dieser radikalbildenden Reaktion entzogen. Die Eigenschaft Metallionen zu binden und ihre Reaktivität somit zu reduzieren, kann als „bindungsabhängige Rolle als Antioxidans“ bezeichnet werden. Weitere Aspekte dieser Rolle beziehen sich auch auf die Bindung von Bilirubin (dies hemmt die Lipidoxidation) (54) In diesem Zusammenhang muss jedoch auch erwähnt werden, dass diese Eigenschaft vor allem dem reduzierten Albumin (Humanes Mercaptalbumin, HMA) zugeschrieben wird. Wird Albumin nämlich oxidiert, verändern sich seine Bindungseigenschaften. (55)

2.2.2 Albumin: Ein Radikalfänger

Albumin enthält ein reduziertes Cystein (Cys34), welches als sehr potenter Radikalfänger fungieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass Albumin auf Grund seiner hohen Konzentration im Blut etwa 70% der „Plasma-Radikalneutralisierungskapazität“ ausmacht.

Albumin enthält 6 Methioninmoleküle und 35 Cysteinreste welche 17 Disulfidbrücken bilden. Das Cysteinmolekül an Stelle 34 ist das einzige freie Cystein im Albuminmolekül dessen, Thiolgruppe (R-SH) ein sehr reagibles Reduktionsmittel darstellt. Obwohl nur ein Cystein des Albumins als Reduktionsmittel reagieren kann, stellt Albumin – aufgrund seiner hohen Konzentration im Blut - den größten Thiolpool im Blut dar.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Abhängig vom Oxidationsstatus dieser Thiolgruppe kann man 3 Albuminspezies unterscheiden (Abbildung 3):

- 1.) Das Mercaptalbumin (HMA): Die Thiolgruppe (auch Mercaptogruppe genannt) liegt in freier Form vor und kann als Reduktionsmittel fungieren.
- 2.) Das Non-Mercaptalbumin 1 (HNA1): Das Cystein 34 hat bei dieser Spezies eine Verbindung mit Glutathion, Cystein oder Homocystein über eine Disulfidbrücke ausgebildet. Diese Verbindung bzw. diese Oxidation ist reversibel, sodass es zwischen HMA und HNA1 einen dynamischen Austausch von kleinen thiolhaltigen Verbindungen gibt.
- 3.) Das Non-Mercaptalbumin 2 (HNA2): Diese Fraktion entsteht bei starkem oxidativen Stress, beispielsweise durch die Wirkung von H_2O_2 und stellt eine irreversible Modifikation des Proteins da. Das Cystein 34 liegt hierbei als Sulfinsäure oder Sulfonsäure vor.

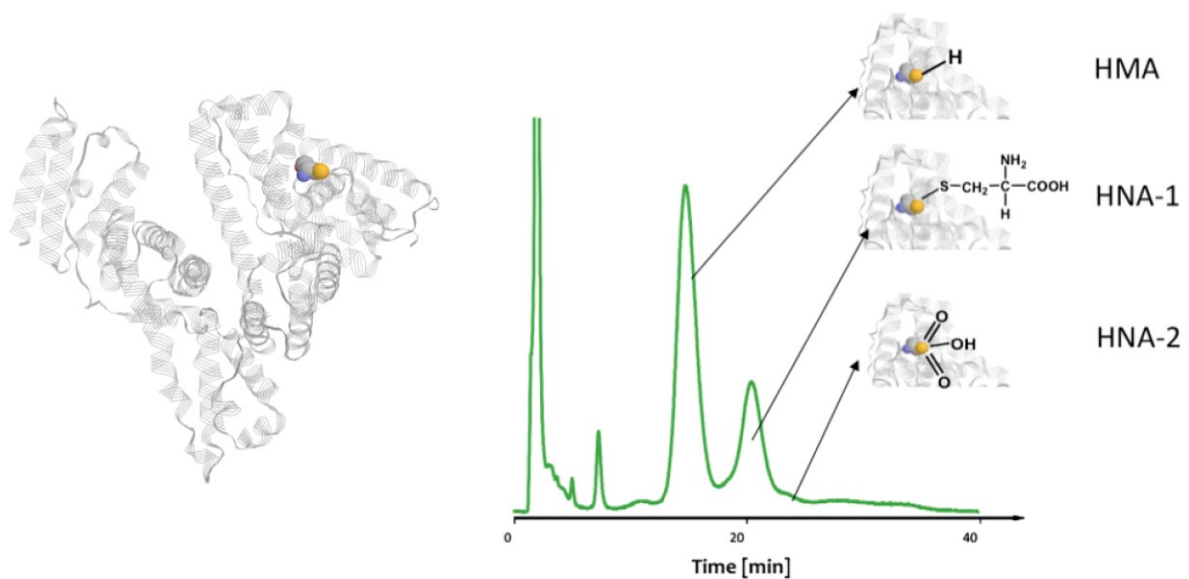


Abbildung 3: Links Albuminmolekül - hervorgehoben ist der freie Thiolrest des Cystein 34; Rechts ein Chromatogramm, die peaks sind entsprechenden der jeweiligen Albuminfraktionen markiert: humanes mercaptalbumin, HMA; human non-mercaptalbumin-1; HNA1; human non-mercaptalbumin-2, HNA2ⁱⁱ

2.3 Das Zusammenspiel reaktiver Sauerstoffspezies und Antioxidantien

2.3.1 Die Dosis macht das Gift

ROS haben also sowohl positive als auch negative Eigenschaften – wie bei fast allem im Leben macht die Dosis das Gift. Kommt es zu einem Auftreten von ROS über die physiologische Menge hinaus oder kann die „zerstörerische“ Wirkung dieser durch andere Faktoren nicht mehr suffizient verhindert werden, spricht man vom Zustand des „oxidativen Stresses“. (56,57)

In diesem Zustand kann eine Schädigung von körpereigenen Molekülen nicht mehr ausreichend verhindert werden. Je nach Lokalisation können Erkrankungen wie das Glaukom, Morbus Parkinson, eine diabetische Polyneuropathie oder die Katarakt entstehen. (21,35,36,38,51,58-62)

Speziell im hinteren Augenabschnitt kann es über zwei verschiedene Wege zur Bildung von ROS kommen:

1.) Im Rahmen der Atmungskette

Die Netzhaut ist eines der stoffwechselaktivsten Gewebe. Geht man davon aus, dass etwa 1-3% des in den Mitochondrien anfallenden Sauerstoffs zu Superoxidradikalen umgewandelt werden, ist besonders hier mit einem hohen Auftreten von ROS zu rechnen. Hierbei ist zu erwähnen, dass Superoxidradikationen die Mitochondrienmembran nicht passieren können, wohl aber Wasserstoffperoxid, welches ein starkes Oxidans darstellt. Es ist neben O_2 das Produkt einer Reaktion von Superoxidradikal und Wasserstoff (siehe Abbildung 4).

2.) Im Rahmen des Sauerstoffabbaues

Wie bereits beschrieben führt der Abbau von Superoxid-Radikalanionen im GK Raum zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Wie auch bei der Atmungskette ist Wasserstoffperoxid hier das mögliche Edukt für etwaigen oxidativen Stress und Ausgangsstoff für freie Radikale.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Aufgrund der zentralen Rolle von Wasserstoffperoxid als Oxidans und mögliches Edukt für freie Radikale soll auf dessen mögliche Reaktionswege gesondert eingegangen werden. Abhängig vom Reaktionspartner kann dieses Molekül zu verschiedenen Produkte reagieren. Die möglichen Abbauwege sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Speziell im Auge scheinen die Reaktionen mit UV Licht und der enzymatische Abbau durch die Katalase unwahrscheinlich.

UV Licht wird nämlich bereits vollständig in den vorderen Augenabschnitten - durch Hornhaut und Linse - absorbiert und erreicht somit den GK Raum nicht. (63)

Ein enzymatischer Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Katalase würde im GK Raum (wieder) zu den Produkten Sauerstoff und Wasser führen – da jedoch gerade der Sauerstoffabbau eine wichtige physiologische Funktion des GK darstellt, erscheint dieser Abbauweg unwahrscheinlich. (4,5,21,22)

Daher scheinen im GK Raum die Reaktionswege zusammen mit Metallionen (Fenton Reaktion - siehe auch Abbildung 1 und Abbildung 4) und der Abbau durch die Glutathionperoxidase von Bedeutung zu sein.

Bei der Fenton Reaktion katalysieren Metallionen den Zerfall von Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen und Hydroxidationen. Die Metallionen werden dabei oxidiert, können aber in Anwesenheit einer reduzierenden Substanz wie z.B.: ASC. wieder reduziert werden, um erneut als Katalysator dienen zu können. Im ASC- reichen GK Milieu würden demnach Spuren von Metallionen ausreichen, um diese Reaktion in Gang zu halten – einzig die Konzentration von ASC wäre der limitierende Faktor.

Beim enzymatischen Abbau von Wasserstoffperoxid durch die Glutathionperoxidase hingegen entstehen im Vergleich zu anderen Reaktionen weder freie Radikale noch Sauerstoff. Zwei Glutathionmoleküle werden im Rahmen dieser Reaktion zu einem Dimer reduziert, als Produkt entsteht dabei Wasser. Diese beiden möglichen Reaktionswege werden später im Experimentierteil behandelt.

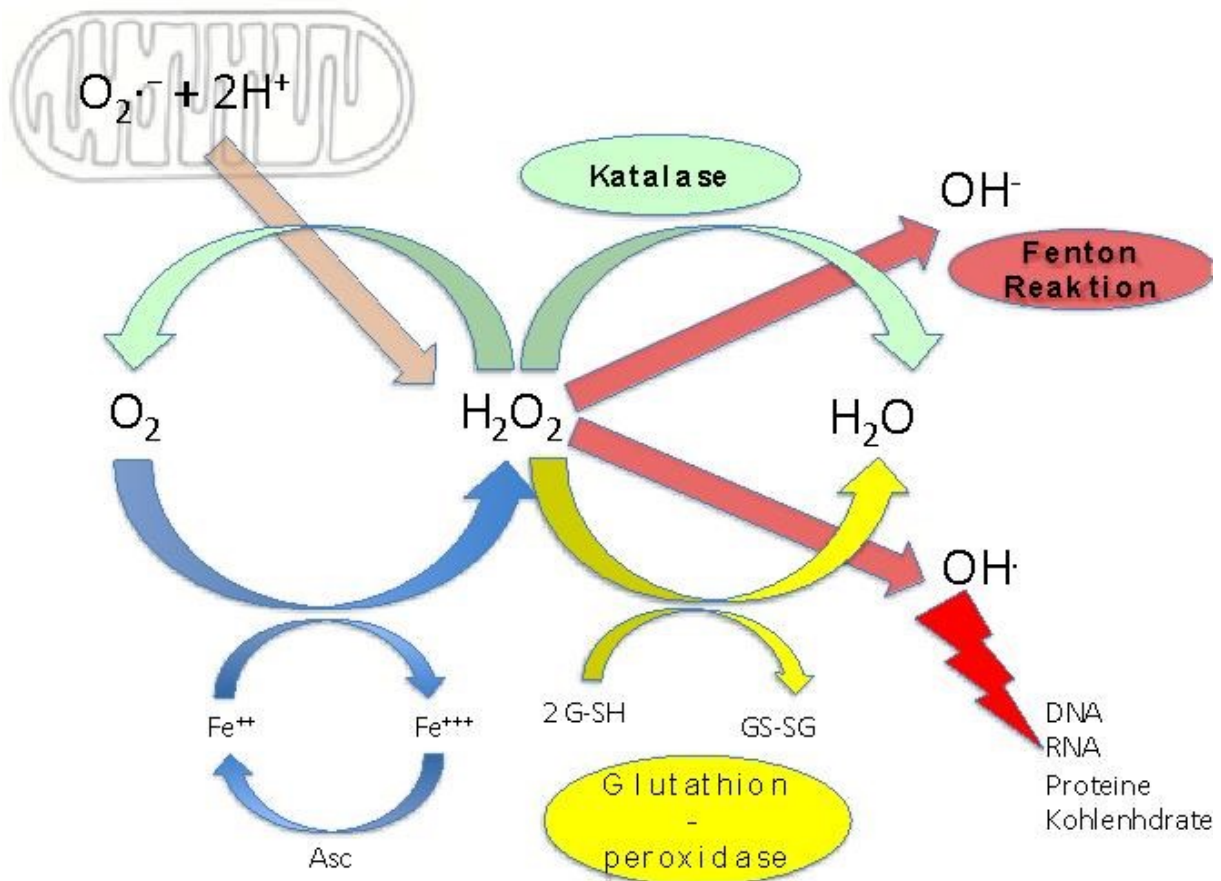


Abbildung 4: Wasserstoffperoxid: Entstehungswege, mögliche enzymatische Abbauwege bzw. deren Produkte sowie potentiell entstehende Radikale. Chemische Bezeichnungen: $OH\cdot$ Hydroxylradikal; OH^- Hydroxidation; H_2O_2 Wasser; O_2 Sauerstoff; GSH Glutathion (reduzierte Form); GSSG Glutathiondimer (oxidierte Form)

Zusammenfassend kann man sagen, dass im GK Raum physiologischer Weise hochreaktive ROS entstehen.

Der Abbauweg jener ROS sowie deren mögliche Bedeutung beim Auftreten von Erkrankungen oder GK Veränderungen in Hinblick auf oxidativen Stress ist bis dato jedoch nur unzureichend erforscht – siehe nächstes Kapitel: „Messung von oxidativem Stress im Glaskörper“

3 Messung von oxidativem Stress im Glaskörper

In der Literatur existieren bereits einige Studien zu dem Thema „oxidativer Stress im GK“. Häufig wird dabei anhand der ASC Konzentration versucht, auf möglichen oxidativen Stress im GK Raum rückzuschließen. (3,64) Aufgrund der ambivalenten Rolle von ASC, welche sowohl als Anti- als auch Prooxidants fungiert, ist dieser Faktor kaum geeignet, um auf das Vorhandensein von oxidativen Stress rückzuschließen.

Carbonylgruppen in Proteinen sind als Marker für oxidativen Stress in diesem Zusammenhang ebenfalls bestimmt worden. (59,65-67) Als direktes Produkt von oxidativem Stress und aufgrund seiner chemischen Stabilität ist dieser Marker besser geeignet als Vitamin C. Ein Nachweis von Carbonylgruppen gibt allerdings nur Rückschluss über das grundsätzliche Vorhandensein von oxidativem Stress. Eine Unterscheidung zwischen schwachen und starken Oxidationsmitteln ist nicht möglich. Speziell der oxidative Einfluss von H_2O_2 , welches im GK anfällt, bleibt bei dieser Methode unberücksichtigt.

Ein neuer Marker für oxidativen Stress ist die Fraktionsanalyse der drei – bereits beschriebenen - Albuminspezies mittels „high performance liquid chromatography“ (HPLC). Albumin kommt auch im GK als Hauptprotein vor, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration als im Plasma. Seine antioxidative Potenz spielt daher neben der hohen Konzentration von Vitamin C eine untergeordnete Rolle.

(3,10,14,15,18,22,23) Abhängig von seinem Redoxzustand sind drei Formen beschrieben: HMA - die reduzierte Form, HNA1 - die durch „milden“ oxidativen Stress reversibel veränderte Form und HNA2 - welches bei starkem oxidativen Stress, beispielsweise durch die Wirkung von H_2O_2 , entsteht und eine irreversible Modifikation des Proteins darstellt. Der Redoxzustand von Albumin hat sich in der rezenten Literatur als guter Indikator für oxidativen Stress erwiesen, da er einen systemischen Zustand widerspiegelt und gut quantifizierbar ist. (50-52,55) Speziell im GK wurde der Redoxzustand von Albumin noch nicht untersucht, erscheint aber für die Erforschung des Zusammenhangs zwischen oxidativer Schädigung und dem Auftreten von Krankheiten im vorderen und hinteren Augenabschnitt besonders interessant.

4 Zielsetzung dieser Arbeit

Thematischer Schwerpunkt dieser Arbeit ist das Vorhandensein (v.a. in Hinblick auf verschiedene Erkrankungen) bzw. die Auswirkungen von ROS im GK Raum. Die vorliegende Arbeit teilt sich dabei in 3 Abschnitte, welche verschiedene Zugänge zu dieser Thematik bieten sollen.

- 1.) Primäres Ziel dieser Arbeit ist es, über die Fraktionsbestimmungen der verschiedenen Albuminspezies in Glaskörperproben auf das etwaige Vorhandensein von oxidativem Stress Rückschlüsse ziehen zu können. Der Redoxzustand von Albumin soll dabei mit dem Auftreten verschiedener Erkrankungen bzw. der Operationsindikation (wie der diabetischen Retinopathie, der Epiretinalen Membran etc.) und dem GK Status (anliegend vs. abgehoben) korreliert werden. Neben der zugrundeliegenden Indikation für die Operation soll auch der Redoxstatus des Serumalbumins in die statistische Auswertung miteinbezogen werden.
- 2.) Die oxidativen Eigenschaften des GK sollen im Labor über verschiedene Experimente beleuchtet werden.
- 3.) Darüber hinaus soll die Auswirkung von oxidativem Stress am Beispiel Glaukom auf den GK (anliegender vs. abgehobener GK) untersucht werden.

Ausführungsteil:

5 Oxidativer Stress im Glaskörperraum

5.1 PatientInnen und Methoden

Für diese Studie wurden 158 Glaskörperproben rekrutiert. Eingeschlossen wurden diese PatientInnen an der Universitäts-Augenklinik. Die Albuminanalyse erfolgte am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz. Die Studie wurde entsprechend der Deklaration nach Helsinki durchgeführt. Vor Beginn der Studie wurde die Zustimmung der örtlichen Ethikkommission eingeholt.

PatientInnen welche, an der Universitäts Augenklinik für die Durchführung einer Vitrektomie aufgenommen wurden, wurden hinsichtlich ihres Einverständnisses zur Studienteilnahme befragt. Eine etwaige Einwilligung wurde durch eine Unterschrift auf einem „Informed consent Bogen“ (dieser wurde im Rahmen des Ethikantrages ebenfalls der örtliche Ethikkommission vorgelegt) dokumentiert. Die Rekrutierung der PatientInnen erfolgt am Tag vor der Operation, die Blutabnahme am Tag der Operation und die Glaskörperprobenabnahme im Rahmen der Operation.

Einschließbar waren alle PatientInnen im Alter zwischen 18 und 99 Jahren, welche für eine Vitrektomie vorgesehen waren. Ausschlusskriterium war eine Grunderkrankung mit sekundären, operationswürdigen Veränderungen (wie z.B.: Glaskörperblutung bei Gefäßentzündung) – in so einem Fall wäre nicht klar welche der beiden Pathologie einen allfällig vorhandenen oxidativen Stress ausgelöst hat, und systemische Erkrankungen, welche mit einem erhöhten Anteil von oxidiertem Albumin einhergehen (Leberzirrhose und dialysepflichtige Niereninsuffizienz).

Der zeitliche Abstand zwischen Blutabnahme und Operation betrug maximal 3 Stunden. Es wurde jeweils ein EDTA-Röhrchen Blut abgenommen, welches anschließend bei 1100 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde dann in ein Eppendorfhütchen pipettiert und zusammen mit der GK Probe mittels Fahrradkurier an das Institut für physiologische Chemie geschickt.

Die GK Probenentnahme erfolgte am Anfang der Operation durch Aspiration von GK aus dem „wasteport“ des Vitrektoms in eine Spritze. Es wurde darauf geachtet, GK immer aus dem Zentrum zu nehmen, da in der Literatur gerade im Zentrum ein niedriger O₂

Partialdruck gemessen wurde und wir daher gerade in diesem Bereich mit Veränderungen rechneten. (30) Um eine Verdünnung der GK Probe durch Spülwasser zu verhindern, wurde gleich nach dem Einführen des Vitrektoms GK gegen Luft (und nicht wie sonst üblich gegen Spülflüssigkeit) ausgetauscht. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass keine Luftbläschen in die Spritze mit der GK Probe gelangten. Etwaig in der Spritze vorhandene Luftbläschen wurden sofort herausgedrückt. Die Spritze wurde daraufhin sofort mit einer Kappe verschlossen, auf „crushed ice“ gelegt und zusammen mit dem Blutplasma an das Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz geschickt sodass eine Analyse des GK innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme erfolgen konnte.

Dieses Zeitfenster wurde aufgrund der Ergebnisse in Vorexperimenten festgelegt: Innerhalb von 2-3 Stunden blieben die verschiedenen Albuminfraktionen konstant, nach dieser Zeit kommt es zu einem zunehmenden Shift in Richtung oxidiertem Albumin.

Bestimmung der Albuminfraktionen nach Redoxzustand

Der Redoxzustand von Albumin wurde durch „high performance liquid chromatography“ (HPLC) bestimmt. Albumin wurde dabei entsprechend der Thiolgruppe des Cystein 34 in drei Fraktionen getrennt:

- HMA: Es liegt eine freie Thiolgruppe vor
- HNA1: Die Thiolgruppe wurde zu einer Disulfidbrücke oxidiert
- HNA2: Höher oxidierte Stadien; (Sulfin oder Sulfonsäure)

Für die Analysen 20µL wurden verdünnter GK bzw. Plasma in das HPLC System (Shodex Asahinak ES-502N 7C Anionen Austauschersäule) injiziert. Mittels Fluoreszenzanalyse (280nm/340nm) wurden die relativen Albuminfraktionen detektiert. Die relative Quantifikation der Fraktionen wurde über die „peak height“ der jeweiligen peaks im Programm EZ Elite chromatography software (VWR, Wien, Österreich) berechnet. Bei allen PatientInnen wurden sowohl im Plasma als auch im GK die verschiedenen Albumin fraktionen gemessen.

Vitamin C Bestimmung

ASC wurde durch eine modifizierte Methode nach Levine et al. bzw. Lykkesfeldt et al. bestimmt. Sofort nach Eintreffen im Labor wurden 50µL GK mit 50µL

Metaphosphorsäure vermenzt und bis zur Analyse bei -80°C gekühlt gelagert. (68-70)

Die ASC Konzentration wurde durch eine HPLC Analyse (hydrophobe Chromatographie mit einer „Zorbax SBC18 Stable Bond 4.6 × 250, 5 µm; Agilent Technologies, Vienna, Austria“ Säule) über einen elektrochemischen Detektor (ESA Coulochem II, Chelmsford, United Kingdom; Model 5011 high-sensitivity analytical cell (ESA) bei -200 mV (E1; upstream) und +150 mV (E2; downstream)) bestimmt.

Die mobile Phase war eine Mischung aus Methanol, Natriumphosphat, wasserfreies Natriumacetat, Dodecyltrimethylammoniumbromid und Tetraoctylammoniumbromid.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Die Dokumentation erfolgte im Programm Excel (Microsoft Excel für Mac 2011; Version 14.6.4), die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Version 22).

Dabei wurden neben den Albuminfraktionen aus Blut und GK folgende Faktoren notiert:

- Geschlecht
- Alter zum Zeitpunkt der Operation
- Indikation für die Operation
- Okuläre Nebendiagnosen (wie z.B.: Glaukom oder Diabetische Retinopathie)
- Diabetesstatus
- Albuminkonzentration aus dem Blut und dem GK
- Eiweißkonzentration aus dem Blut und dem GK
- Linsenstatus (Phak vs. Pseudophak)
- GK Status (ermittelt während der Operation, unterteilt in „anliegend“; „partiell abgehoben“; „vollständig abgehoben“)
- ASC Konzentration

Die gewonnenen GK wurden basierend auf einer intensiven Literaturrecherche in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese Gruppeneinteilung orientierte sich an dem Vorhandensein von Faktoren, welche mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wurden. Bei jeder Gruppe wurde genau darauf geachtet, dass die eingeschlossenen Augen keine weiteren Diagnosen/Faktoren aufwiesen, welche mit oxidativem Stress in Verbindung stehen.

- Kontrollgruppe

In diese Gruppe wurden nur Augen eingeschlossen, welche aufgrund einer Krankheit vitrektomiert wurden, die in der rezenten Literatur nicht mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. Eine genaue Aufschlüsselung der Diagnosen ist Tabelle 8 zu entnehmen.

- Pseudophakie

In diese Gruppe wurden pseudophake Augen eingeschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kataraktoperation im Rahmen einer Vitrektomie mit einer Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes einhergeht.(3) Dies könnte zu oxidativem Stress führen.

- Glaukom

Einschlusskriterium für diese Gruppe war das Vorhandensein eines Glaukoms. Der Ganglienzell - Untergang wurde in vielen Studien mit dem Auftreten von ROS in Verbindung gebracht, sodass diese Erkrankung als eigene Gruppe geführt wurde.(60,61,70)

- Diabetes

Obwohl Diabetes an sich keine augenspezifische Erkrankung ist bzw. nicht zwangsweise mit Veränderungen der Netzhaut einhergehen muss, wurden alle PatientInnen, welche an dieser gestörten Stoffwechsellage litten, in diese Gruppe eingeordnet – in der Literatur wurde Diabetes eng mit oxidativem Stress der Retina in Verbindung gebracht.(43) In dieser Gruppe finden sich verschiedene Stadien der diabetischen Retinopathie (sowohl nicht proliferative- als auch proliferative). Diese Stadien wurde in der statistischen Analyse ebenfalls berücksichtigt.

- Submakuläre Blutungen (im Rahmen einer feuchten Makuladegeneration)

Musste aufgrund einer submakulären Blutung auf Basis einer feuchten Makuladegeneration eine Vitrektomie durchgeführt werden, wurde der entnommene GK in diese Gruppe stratifiziert. Eine feuchte Makuladegeneration ist nicht nur mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht worden – es gibt darüber hinaus Hinweise, dass eine Therapie mit Antioxidantien den Verlauf der Erkrankung günstig beeinflussen kann.(55-58)

- Amotiones

Die äußeren Schichten der Netzhaut werden vom Pigmentepithel ernährt. Kommt es zu einer Trennung von Netzhaut und Pigmentepithel (Netzhautablösung oder Amotio genannt) können die äußeren Netzhautschichten nicht mehr versorgt werden – eine mögliche Folge der gestörten Stoffwechsellage ist das vermehrte Auftreten von ROS.(55)

5.1.1 Statistische Auswertung

Kategoriale Variablen sind als Häufigkeiten und Prozent angegeben, kontinuierliche Parameter als Minimum, Maximum, Mittelwert, Median und Standardabweichung. Für Gruppenvergleiche wurden parametrische Tests im Falle einer Normalverteilung bzw. nichtparametrische Tests im Falle keiner Normalverteilung durchgeführt. Die jeweiligen statistischen Tests sind gesondert angeführt. Korrelationen wurden mittels der Spearman Rangkorrelation untersucht. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Allgemeine Beschreibung der Daten

Von den 156 akquirierten GK konnten 140 GK (von 72 (51,40%) weiblichen und 68 (48,60%) männlichen PatientInnen) in die Auswertung eingeschlossen werden. 16 GK mussten nach der GK Entnahme ausgeschlossen werden, die genauen Gründe für den Ausschluss sind in Tabelle 1 angegeben.

Grund für Ausschluss	Anzahl
(Unerwarteter) entzündlicher Prozess hinter GK Blutung (Vaskulitis)	1
Luft in Spritze	5
Fehler beim dem HLPC Durchgang	2
zu lange Transportzeit (>2 Stunden)	4
Deckel der Spritze hat sich beim Transport gelöst	2
zu wenig GK gewonnen	2
Summe	16

Tabelle 1: Auflistung der Ausschlussgründe

Das durchschnittliche Alter der PatientInnen betrug 72 Jahre (73 medianes Alter, range 38-93 Jahre; Standardabweichung 8,40 Jahre).

Die absoluten und relativen Werte der Indikationen für die Vitrektomien sind in Abbildung 5 dargestellt.

Oxidativer Stress im Glaskörper

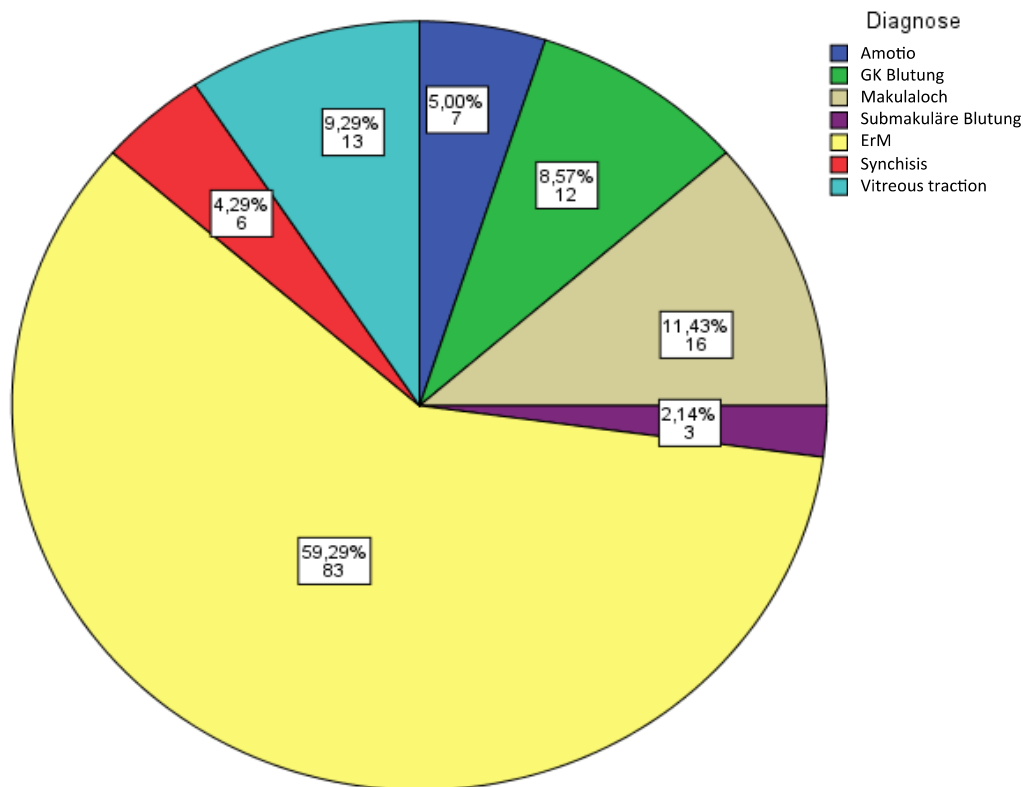


Abbildung 5: Graphische Darstellung der absoluten und relativen Werte der Indikationen für die Vitrektomien

5.2.2 Albuminkonzentration

Bei 77 PatientInnen wurde die Plasmaalbumin- und bei 139 die GK Albuminkonzentration erfasst. (Nicht bei allen Proben war genug Material vorhanden) Für eine deskriptive Statistik der Albuminkonzentrationen siehe Tabelle 2.

	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Albumin GK MW-BLK (g/dL)	0,20	0,16	0,05	0,65	±0,13
Blut Albumin (g/dL)	4,17	4,10	3,50	5,10	±0,27

Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Albuminkonzentrationen

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang (Spearman Korrelationskoeffizient -0,01) zwischen der Albuminkonzentration im GK und im Plasma ermittelt werden.

5.2.3 Albuminfraktionen in Plasma und GK

Das Albumin wurde mittels HPLC in seine redoxabhängigen relativen Fraktionen aufgeschlüsselt. Die ermittelten relativen Albuminfraktionen aus dem Plasma sind aus Tabelle 3 zu entnehmen, jene des GKs aus Tabelle 4.

Plasma	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA (%)	70,44	70,95	53,00	93,70	±5,70
HNA1 (%)	27,71	27,48	4,90	44,90	±5,60
HNA2 (%)	1,84	1,70	0,00	7,13	±0,90

Tabelle 3: Die relativen Albuminfraktionen aus dem Plasma

Glaskörper	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA (%)	67,07	65,25	33,40	95,00	14,51
HNA1 (%)	28,13	28,70	5,00	54,80	13,08
HNA2 (%)	4,81	3,70	0,00	24,00	4,24

Tabelle 4: Die relativen Albuminfraktionen aus dem GK

In einem statistischen Vergleich der Albuminfraktionen zwischen Plasma und GK durch einen Wilcoxon-Vorzeichenrangtest konnten für HMA ($p=0,015$) und HNA1 ($p<0,0001$) statistisch signifikante Unterschiede, nicht jedoch für HNA2 ($p=0,737$) festgestellt werden.

5.2.4 Gruppenvergleiche

Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Assoziationen mit oxidativem Stress wurden die gewonnenen Glaskörper in 6 Gruppen unterteilt – siehe Tabelle 5. Die Aufschlüsselung der verschiedenen Gruppen nach der Indikation für die Vitrektomie sind aus Tabelle 6 zu entnehmen.

	Häufigkeit	Prozent
Kontrollgruppe	73	52,14
Pseudophakie	14	10,00
Glaukom	11	7,86
Diabetes	32	22,85
Submakuläre Blutung	3	2,14
Amotio	7	5,00
Gesamt	140	100,00

Tabelle 5: Stratifizierung der GK in 6 Gruppen: PatientInnen Anzahl

	Diagnose						
	Amotio	GK Blutung	Makulaloch	ErM	Submakuläre Blutung	Synchisis	Vitreous traction
	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl	Anzahl
Kontrollgruppe	0	0	12	49	0	5	7
Pseudophakie	0	0	2	11	0	0	1
Glaukom	0	0	0	10	0	0	1
Diabetes	0	11	2	14	0	1	4
Submakuläre Blutung	0	0	0	0	3	0	0
Amotio	7	0	0	0	0	0	0

Tabelle 6: Aufschlüsselung der Gruppen nach eingeschlossenen Diagnosen

5.2.4.1 Albumin Menge im GK

In Tabelle 7 sind die ermittelten Albuminkonzentrationen unter Berücksichtigung der Gruppeneinteilung angeführt. Eine graphische Darstellung findet sich unter Abbildung 6. Die Konzentrationen unterschieden sich signifikant in Abhängigkeit von der Diagnose: Besonders Erkrankungen mit einer Störung der Blut-Retina Schranke wiesen höhere Albuminkonzentrationen (e.g. Netzhautablösungen, submakuläre Blutungen und Diabetiker) im GK auf.

	Albumin GK MW-BLK (mg/mL)			
	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standardabweichung
Kontrollgruppe	1,71	0,45	6,48	±1,25
Pseudophakie	1,54	0,48	4,54	±1,19
Glaukom	1,64	0,51	3,10	±0,86
Diabetes	2,72	0,64	4,94	±1,32
Submakuläre Blutung	3,16	2,35	3,97	±1,14
Amotio	1,88	0,75	3,96	±1,37

Tabelle 7: Albuminkonzentration des GK unter Berücksichtigung der Indikation für die Vitrektomie

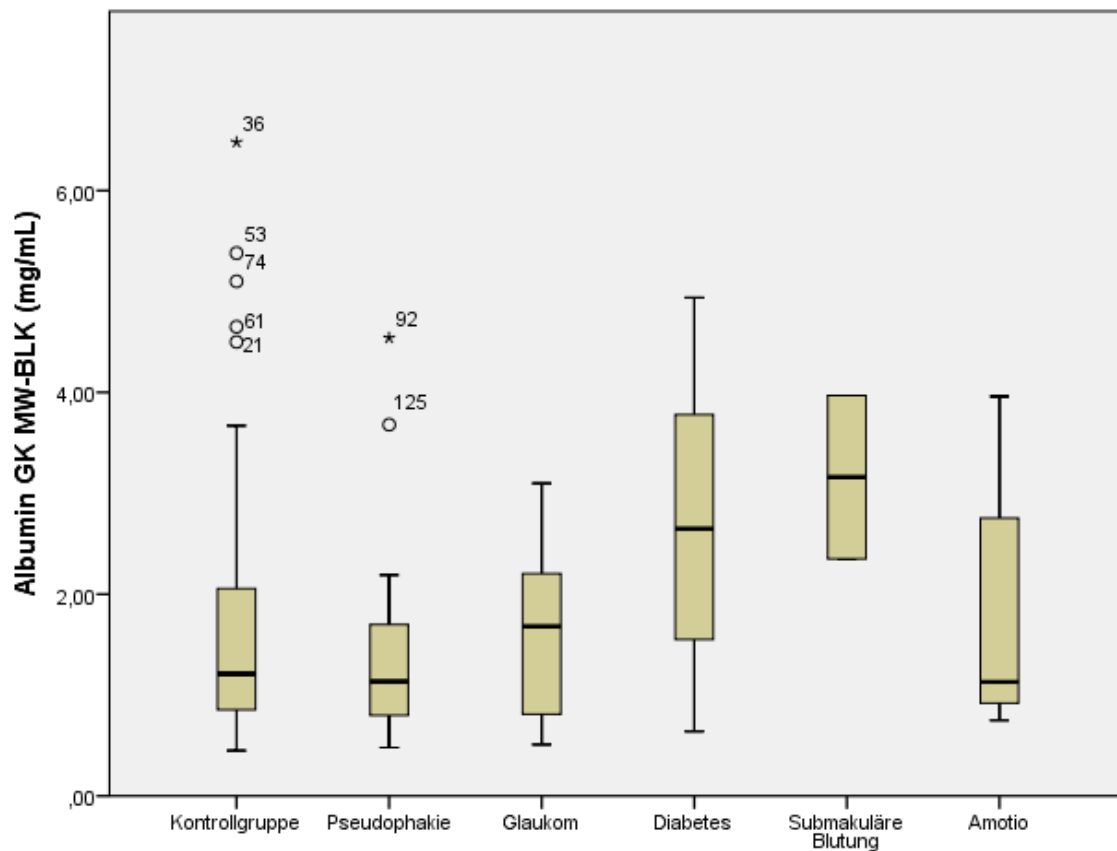


Abbildung 6: Albuminkonzentration des GK unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung (MW-BLK: Mittelwert-blank)

5.2.4.2 Beschreibung der Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden verschiedene Diagnosen (hinsichtlich der Indikation für die Vitrektomie) (Tabelle 8) eingeschlossen. Wie bereits aus Tabelle 6 zu entnehmen, waren alle Augen in dieser Gruppe phak. In dieser Gruppe wurden weiters keine PatientInnen mit Diabetes, Glaukom oder anderen Augenerkrankungen, welche in der Literatur mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wurden, eingeschlossen.

		Häufigkeit	Prozent
Diagnosen	Makulaloch	12	16,43
	ErM	49	67,12
	Synchisis	5	6,84
	Vitreous traction	7	9,58
	Gesamt	73	100,00

Tabelle 8: Diagnosen in der Kontrollgruppe

5.2.4.3 Kontrollgruppe: Albuminfraktionen aus GK und Plasma

Eine detaillierte Aufschlüsselung der Albuminfraktionen aus der Kontrollgruppe ist Tabelle 9 zu entnehmen.

	Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standardabweichung
HMA GK	64,03	63,50	91,40	37,80	±13,07
HNA1 GK	30,67	29,70	54,70	6,70	±11,54
HNA2 GK	5,31	4,00	24,00	0,00	±4,49
HMA Blut	70,86	71,30	80,40	53,00	±4,84
HNA1 Blut	27,30	27,20	44,90	16,80	±4,84
HNA2 Blut	1,83	1,70	3,90	0,00	±0,85

Tabelle 9: Aufschlüsselung der Albuminfraktionen der Kontrollgruppe aus Plasma und GK

In der Kontrollgruppe unterschieden sich zwischen GK und Plasma alle Albuminfraktionen signifikant – das GK Albumin war zu einem höheren Anteil oxidiert. (Wilcoxon Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben: HMA: $p < 0,001$; HNA1: $p = 0,005$; HNA2: $p < 0,001$)

Oxidativer Stress im Glaskörper

5.2.4.3.1 Kontrollgruppe: Albuminfraktionen und Diagnose

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Albuminfraktionen aus dem Blut bzw. dem GK innerhalb der Kontrollgruppe - zwischen den Indikationen für die Vitrektomie unterscheiden. Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 7, eine tabellarische Auflistung der einzelnen Werte in Tabelle 10.

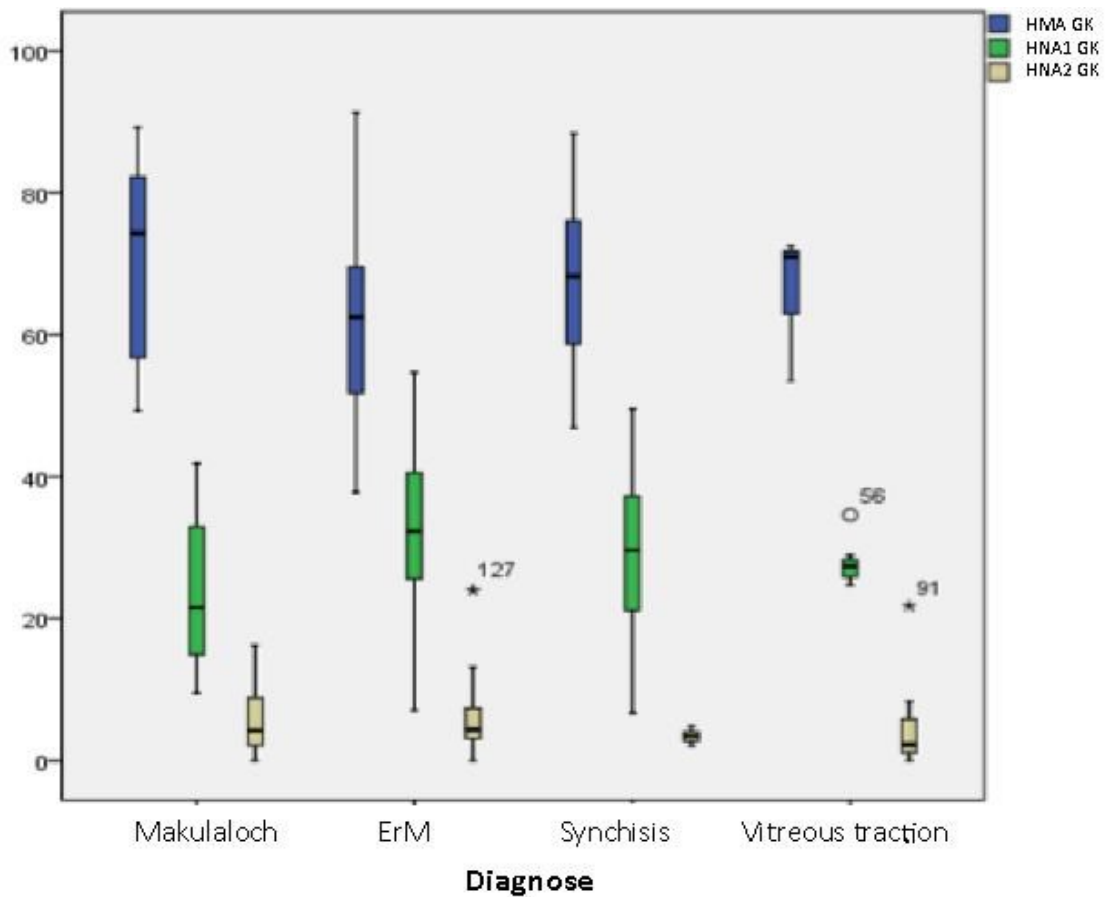


Abbildung 7: Albuminfraktionen des Glaskörpers graphisch aufgeschlüsselt nach Diagnose

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standard- abweichung
HMA GK	Diagnose	Makulaloch	70,62	74,35	89,20	49,30	±14,19
		ErM	61,68	62,50	91,40	37,80	±12,79
		Synchisis	67,68	68,30	88,40	46,90	±15,91
		Vitreous traction	66,65	71,00	72,58	53,50	±7,18
HNA1 GK	Diagnose	Makulaloch	23,61	21,55	41,90	9,50	±10,27
		ErM	32,97	32,30	54,70	7,10	±11,53
		Synchisis	28,90	29,70	49,60	6,70	±16,22
		Vitreous traction	27,90	27,42	34,60	24,70	±3,29
HNA2 GK	Diagnose	Makulaloch	5,78	4,25	16,30	0,00	±4,99
		ErM	5,36	4,40	24,00	0,00	±4,07
		Synchisis	3,48	3,50	4,90	2,10	±1,09
		Vitreous traction	5,44	2,30	21,80	0,00	±7,75

Tabelle 10: Albuminfraktionen des Glaskörpers aus der Kontrollgruppe tabellarisch aufgelistet nach Diagnose

Mittels Kruskal-Wallis Test konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied - für keine der GK Albuminfraktionen - zwischen den verschiedenen Diagnosen gab (HMA: $p=0,192$; HNA1: $p=0,072$; HNA2: $p=0,517$).

5.2.4.3.2 Diagnosen und Albuminfraktionen im Blut

Weiters wurde untersucht, ob sich die Albuminfraktionen des Plasma zwischen den verschiedenen Diagnosen unterscheiden. Eine graphische Darstellung der Plasma Albuminfraktionen findet sich in Abbildung 8, eine Aufschlüsselung der Werte in Tabelle 11.

Oxidativer Stress im Glaskörper

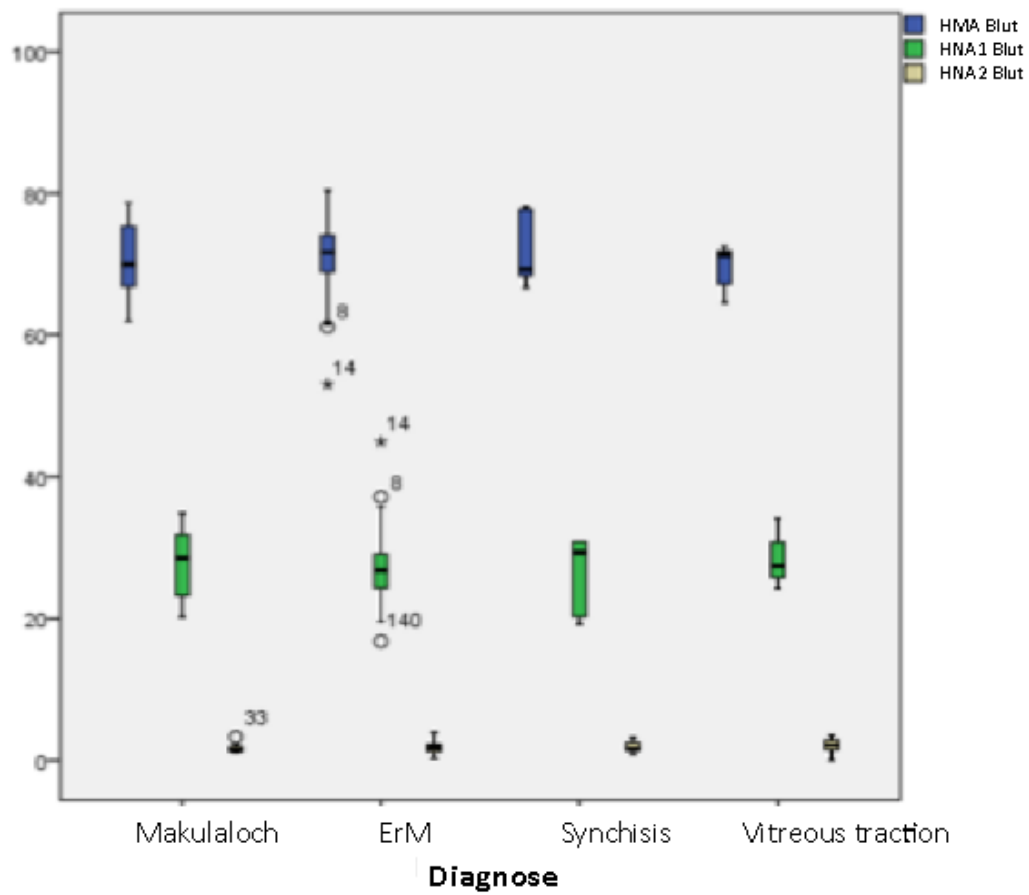


Abbildung 8: Albuminfraktionen des Plasmas aufgeschlüsselt nach Diagnose

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standard- abweichung
HMA Plasma	Diagnose	Makulaloch	70,76	70,00	78,70	61,90	±5,38
		ErM	70,95	71,70	80,40	53,00	±4,94
		Synchisis	72,04	69,30	78,10	66,70	±5,43
		Vitreous traction	69,53	71,30	72,60	64,60	±3,25
HNA1 Plasma	Diagnose	Makulaloch	27,57	28,50	34,80	20,20	±5,01
		ErM	27,20	26,80	44,90	16,80	±4,94
		Synchisis	26,08	29,30	30,80	19,20	±5,82
		Vitreous traction	28,40	27,40	34,10	24,20	±3,71
HNA2 Plasma	Diagnose	Makulaloch	1,67	1,45	3,30	1,10	±0,62
		ErM	1,83	1,80	3,90	,30	±0,85
		Synchisis	1,90	1,60	3,20	,80	±0,95
		Vitreous traction	2,07	2,20	3,60	0,00	±1,238

Tabelle 11: Albuminfraktionen des Plasmas aufgeschlüsselt nach Diagnose

Wie bei der vorangegangenen Analyse konnte mittels Kruskal-Wallis Test gezeigt werden, dass es keinen Unterschied - für keine der Albuminfraktionen im Blut - zwischen den verschiedenen Gruppen gab. (HMA: $p=0,758$; HNA1: $p=0,881$; HNA2: $p=0,728$)

5.2.4.3.3 Einfluss des Alters auf die Albuminfraktionen des GKs und Plasma

Um den Einfluss des Alters auf den Albuminredoxzustand zu bestimmen, wurden weitere Analysen innerhalb der Kontrollgruppe durchgeführt.

In Tabelle 12 ist die Verteilung des Alter in der Kontrollgruppe dargestellt. Während im Plasma HMA (Abnahme mit zunehmendem Alter) und HNA1 (Zunahme mit zunehmendem Alter) mit dem Alter korrelierte, konnte für HNA2 keine Korrelation detektiert werden. auf.

	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Alter	71,90	73,00	38,00	93,00	±8,40

Tabelle 12: Verteilung des Alters in der Kontrollgruppe

Oxidativer Stress im Glaskörper

Im GK hingegen konnten für HMA und HNA1 keine signifikanten Korrelationen mit dem Alter erhoben werden während HNA2 mit zunehmendem Alter signifikant abnahm - eine genaue Aufschlüsselung der Korrelationen sind aus Tabelle 13 zu entnehmen.

Spearman-Rho		Alter
HMA GK	Korrelationskoeffizient	0,090
	Sig. (1-seitig)	0,225
HNA1 GK	Korrelationskoeffizient	0,023
	Sig. (1-seitig)	0,423
HNA2 GK	Korrelationskoeffizient	-0,230
	Sig. (1-seitig)	0,025
HMA Plasma	Korrelationskoeffizient	-0,433
	Sig. (1-seitig)	0,000
HNA1 Plasma	Korrelationskoeffizient	0,408
	Sig. (1-seitig)	0,000
HNA2 Plasma	Korrelationskoeffizient	0,091
	Sig. (1-seitig)	0,222

Tabelle 13: Korrelationen der Albuminfraktionen aus Plasma und GK mit dem Alter

5.2.4.4 Albuminfraktionen und GK Status

Der GK- Status stratifiziert in „anliegend“, „partiell abgehoben“ und „abgehoben“ wurde innerhalb der Kontrollgruppe ebenfalls hinsichtlich des GK - Albumin Redoxstatus statistisch ausgewertet: Ein anliegender GK wurde in 23,2% (n=17), ein partiell abgehobener in 11,0% (n=8) und ein vollständig abgehobener in 65,8% (n=48) intraoperativ diagnostiziert. Eine graphische Darstellung der Albuminfraktionen unter Berücksichtigung des GK Status findet sich in Abbildung 9, eine tabellarische Aufschlüsselung der Werte in Tabelle 14.

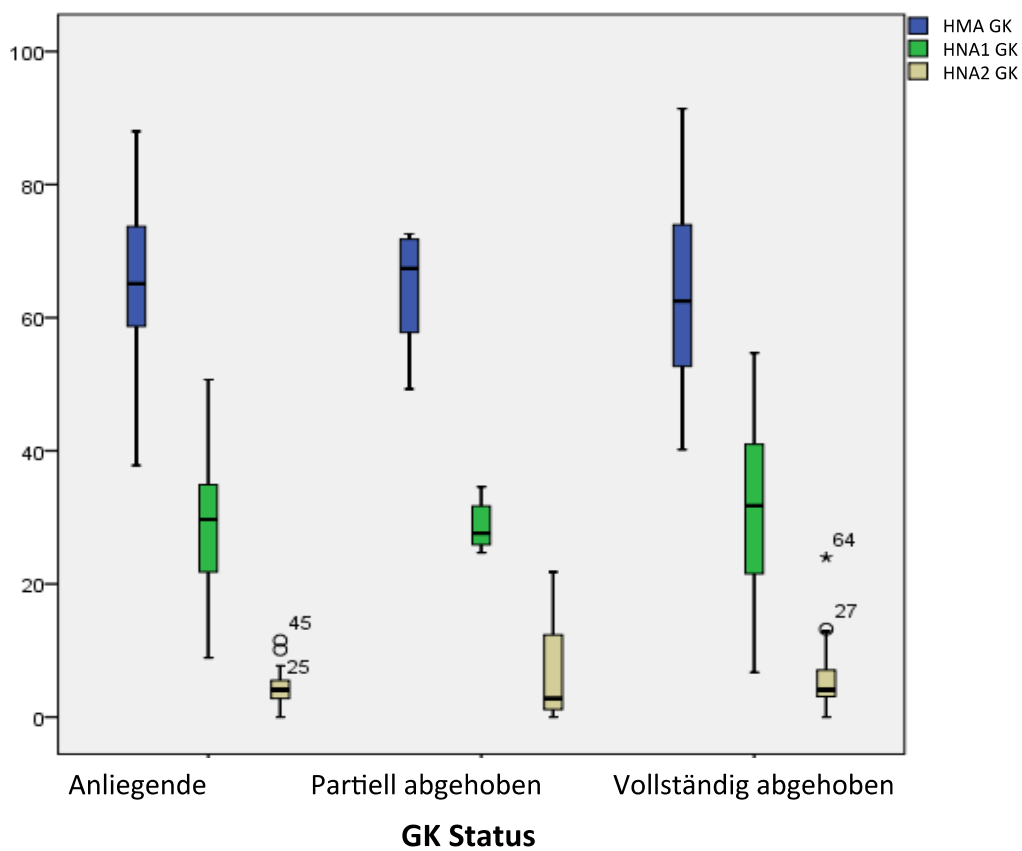


Abbildung 9: Albuminfraktionen des Glaskörpers mit Berücksichtigung des Glaskörperstatus

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standardabweichung
HMA GK	GK- Status	Anliegend	65,76	65,10	88,00	37,80	±12,96
		Partiell abgehoben	64,48	67,40	72,58	49,30	±9,05
		Vollständig abgehoben	63,35	62,50	91,40	40,20	±13,81
HNA1 GK	GK- Status	Anliegend	29,74	29,70	50,70	8,90	±11,48
		Partiell abgehoben	28,71	27,61	34,60	24,70	±3,82
		Vollständig abgehoben	31,32	31,75	54,70	6,70	±12,47
HNA2 GK	GK- Status	Anliegend	4,51	4,10	11,50	0,00	±3,22
		Partiell abgehoben	6,80	2,80	21,80	0,00	±8,13
		Vollständig abgehoben	5,34	4,10	24,00	0,00	±4,11

Tabelle 14: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt nach Glaskörperstatus

Die Albuminfraktionen wurden mittel Kruskal-Wallis Test bei unabhängigen Stichproben verglichen, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen GK Stadien zeigten (HMA: $p=0,0725$; HNA1: $p=0,742$; HNA2: $p=0,704$).

5.2.4.5 Gruppenvergleich: Kontrollgruppe vs. Pseudophakie

Es wurden insgesamt 14 pseudophake Augen (16,10%) in die Studie eingeschlossen und in der statistischen Analyse mit der Kontrollgruppe ($n=73$; 83,90%) verglichen. Die Aufschlüsselung der Diagnosen ist Tabelle 6 zu entnehmen, die relativen Albuminfraktionen aus dem GK der beiden Gruppen sind Tabelle 15 bzw. Abbildung 10 zu entnehmen, jene aus dem Plasma finden sich in Tabelle 16 bzw. Abbildung 11.

			Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standardabweichung
HMA GK	Gruppe	Kontrollgruppe	64,03	63,50	91,40	37,80	±13,069
		Pseudophakie	66,60	65,25	88,20	44,30	±14,759
HNA1 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	30,67	29,70	54,70	6,70	±11,537
		Pseudophakie	28,63	31,50	47,60	6,60	±13,583
HNA2 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	5,31	4,00	24,00	0,00	±4,491
		Pseudophakie	4,76	3,79	16,90	0,00	±4,237

Tabelle 15: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem GK zu Pseudophakie- und Kontrollgruppe

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Maximum	Minimum	Standardabweichung
HMA Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	70,86	71,30	80,40	53,00	±4,84
		Pseudophakie	71,11	72,00	79,70	60,10	±5,48
HNA1 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	27,30	27,20	44,90	16,80	±4,84
		Pseudophakie	27,20	26,35	37,70	17,70	±5,50
HNA2 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	1,83	1,70	3,90	0,00	±0,85
		Pseudophakie	1,68	1,60	2,60	0,80	±0,57

Tabelle 16: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem Plasma zu Pseudophakie- und Kontrollgruppe

Oxidativer Stress im Glaskörper

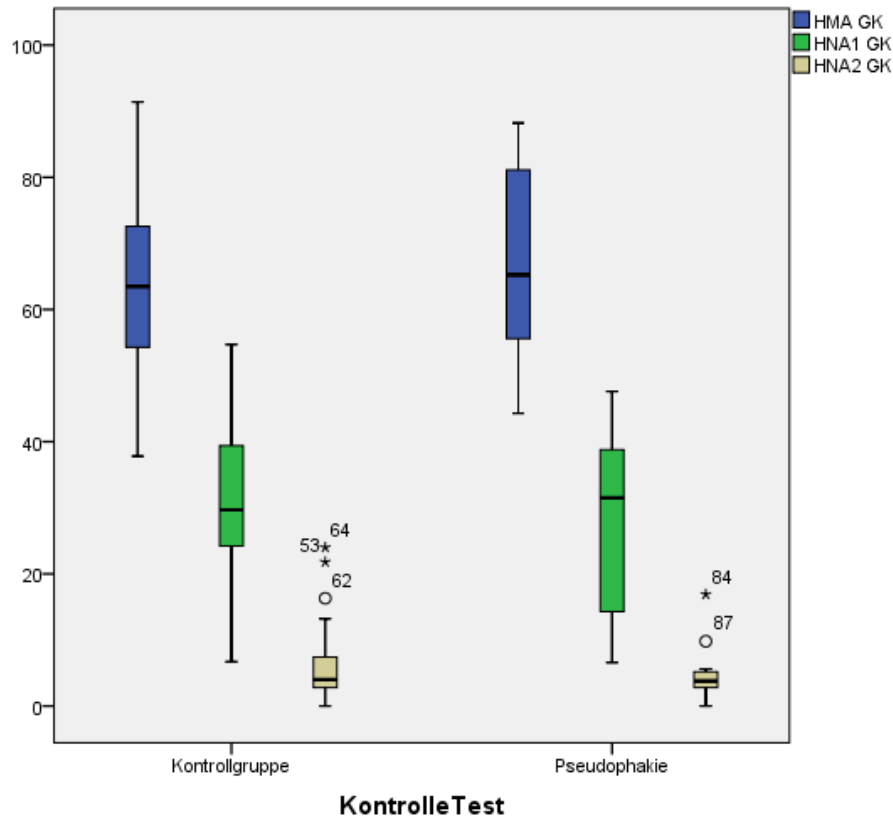


Abbildung 10: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung des Linsenstatus

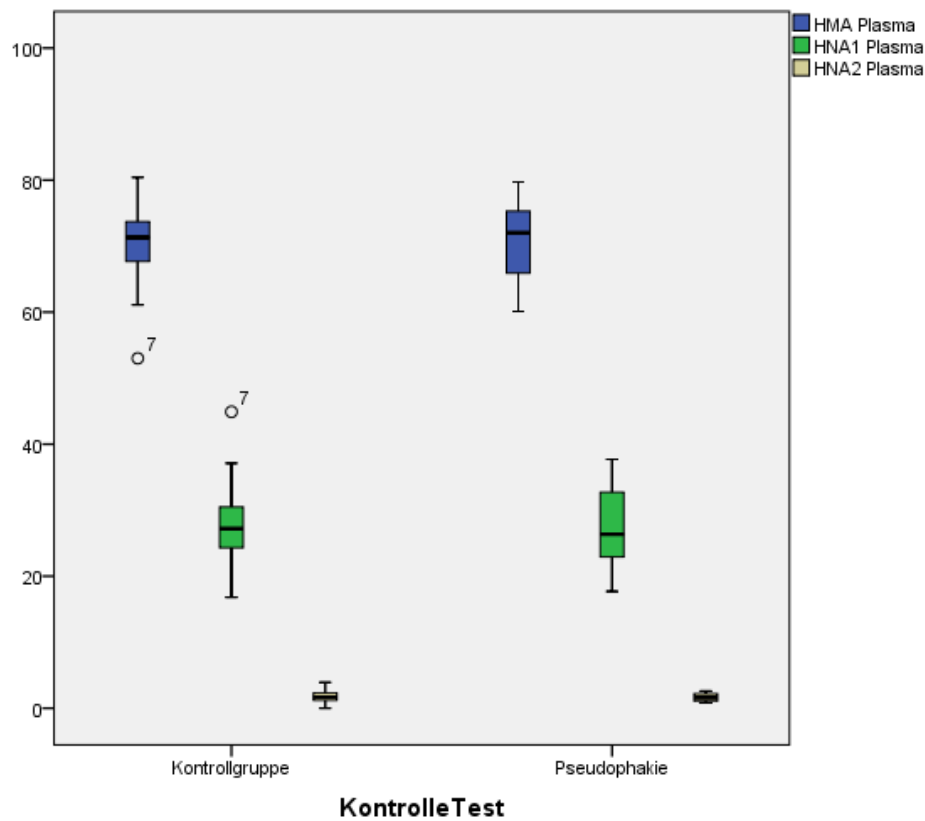


Abbildung 11: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung des Linsenstatus

Oxidativer Stress im Glaskörper

Beim Vergleich der „Kontrollgruppe“ mit der „Pseudophakiegruppe“ mittels Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben (Kontrollgruppe vs. Pseudophakiegruppe) konnten keine signifikante Unterschiede der Albuminfraktionen des GK (HMA: $p=0,636$; HNA1: $p= 0,799$; HNA2: $p=0,724$) oder der Albuminfraktionen des Plasmas (HMA: $p=0,831$; HNA1: $p= 0,945$; HNA2: $p=0,698$) beobachtet werden.

5.2.4.6 Gruppenvergleich Kontrollgruppe vs. Glaukom

Es wurden insgesamt 11 glaukomerkrankte Augen (13,10%) in die Studie eingeschlossen und in der statistischen Analyse mit der Kontrollgruppe (n=73; 83,90%) verglichen. Die Aufschlüsselung der Diagnosen ist Tabelle 6 zu entnehmen, die relativen Albuminfraktionen aus dem GK sind in Tabelle 17 bzw. Abbildung 12 dargestellt, jene aus dem Plasma in Tabelle 18 bzw. Abbildung 13.

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	Gruppe	Kontrollgruppe	64,03	63,50	37,80	91,40	13,07
		Glaukom	56,22	56,30	49,20	64,20	4,76
HNA1 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	30,67	29,70	6,70	54,70	11,54
		Glaukom	39,51	41,70	28,50	45,80	6,09
HNA2 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	5,31	4,00	0,00	24,00	4,49
		Glaukom	4,28	3,90	0,00	9,20	2,57

Tabelle 17: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem GK zu Glaukom- und Kontrollgruppe

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	53,00	70,86	71,30	80,40	±4,84
		Glaukom	64,10	70,31	70,30	76,80	±4,47
HNA1 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	16,80	27,30	27,20	44,90	±4,84
		Glaukom	21,60	27,97	28,20	33,10	±4,06
HNA2 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	0,00	1,83	1,70	3,90	±0,85
		Glaukom	0,80	1,72	1,50	3,70	±0,78

Tabelle 18: Relative Verteilung der Albuminfraktionen aus dem Plasma zu Glaukom- und Kontrollgruppe

Durch einen Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben (Kontrollgruppe vs. Glaukomgruppe) konnten signifikante Unterschiede der Albuminfraktionen HMA (p=0,046) und HNA1 (p=0,010), nicht jedoch von HNA2 (p=0,791) des GK festgestellt werden. Die Albuminfraktionen des Plasmas (HMA: p=0,587; HNA1: p= 0,495; HNA2: p=0,619) unterschieden sich nicht.

Oxidativer Stress im Glaskörper

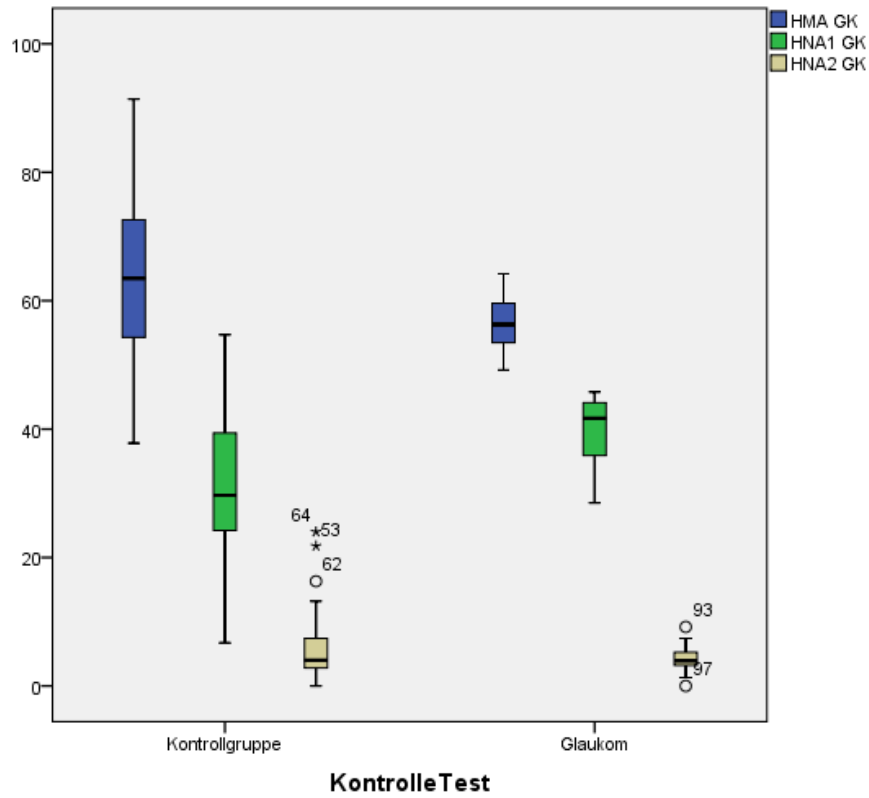


Abbildung 12: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose „Glaukom“

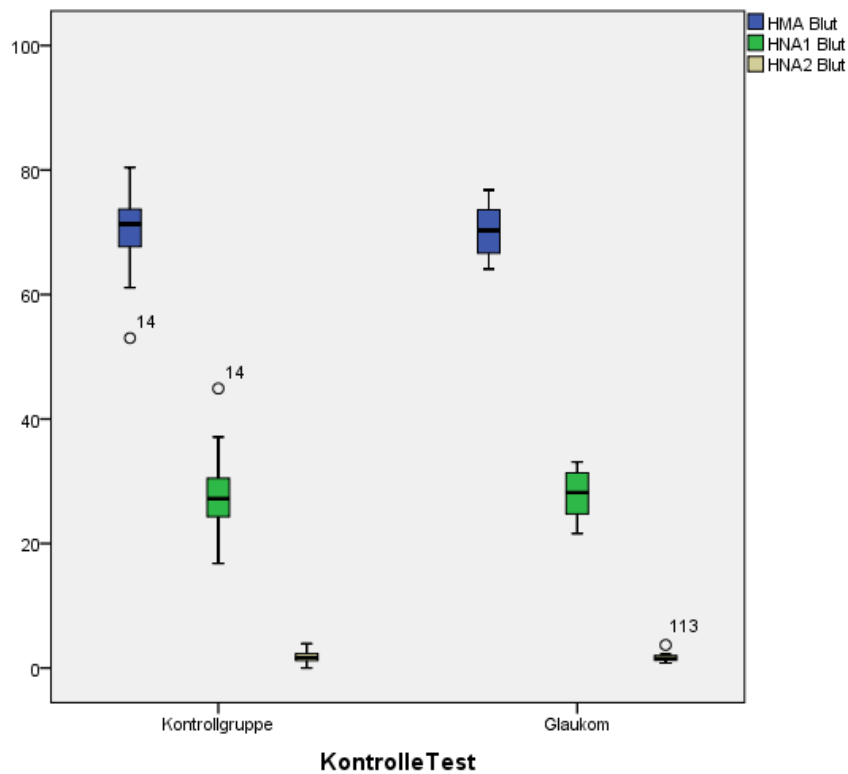


Abbildung 13: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose „Glaukom“

5.2.4.7 Gruppenvergleich Kontrollgruppe vs. Diabetes

Es wurden insgesamt 32 (30,50%) an Diabetes mellitus erkrankte PatientInnen in die Studie eingeschlossen und in der statistischen Analyse mit der Kontrollgruppe (n=73; 69,50%) verglichen. Die Aufschlüsselung der Diagnosen der „Diabetesgruppe“ ist Tabelle 19 zu entnehmen, die relativen Albuminfraktionen aus dem GK der beider Gruppen finden sich in Abbildung 14 bzw. Tabelle 20.

	Häufigkeit	Prozent
GK Blutung	11	10,48%
Makulaloch	14	13,33%
ErM	63	60,00%
Synchisis	6	5,71%
Vitreous traction	11	10,47%
Gesamt	105	100,00%

Tabelle 19: Aufschlüsselung der Diagnosen der „Diabetesgruppe“; Alle PatientInnen mit einer GK Blutung wiesen eine proliferative diabetische Retinopathie auf.

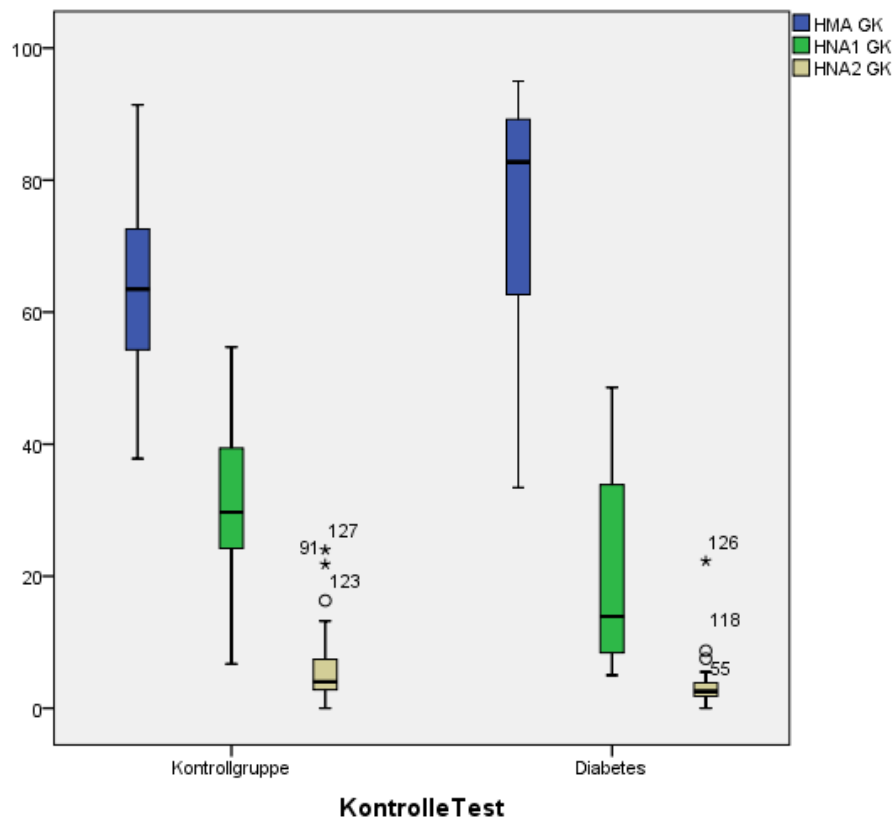


Abbildung 14: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt nach Diabetes Status

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	Gruppe	Kontrollgruppe	64,03	63,50	37,80	91,40	±13,07
		Diabetesgruppe	76,34	82,75	33,40	95,00	±15,67
HNA1 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	30,67	29,70	6,70	54,70	±11,54
		Diabetesgruppe	20,27	13,90	5,00	48,60	±14,36
HNA2 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	5,31	4,00	0,00	24,00	±4,49
		Diabetesgruppe	3,41	2,55	0,00	22,30	±3,96

Tabelle 20: Relativen Albuminfraktionen aus dem Glaskörper für die Kontroll- und die Diabetesgruppe

Da die Diabetesgruppe eine sehr heterogene Gruppe darstellte (insbesondere hinsichtlich proliferativer- (alle GK Blutungen) und nicht proliferativer diabetischer Retinopathien) (siehe Tabelle 21), wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Albuminfraktionen hinsichtlich der Diagnose/Indikation für die Vitrektomie unterschieden – dies war jedoch nicht der Fall (Kruskal Wallis- Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p=0,285$; HNA1: $p=0,144$; HNA2 $p=0,320$). Eine graphische Darstellung der GK Albuminfraktionen unter Berücksichtigung der Indikation für die Vitrektomie findet sich in Abbildung 15, eine tabellarische Aufschlüsselung in Tabelle 22.

Auch für die Plasmaalbuminfraktionen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden: (Kruskal Wallis- Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p=0,305$; HNA1: $p=0,508$; HNA2 $p=0,121$)

Albumin im GK war bei Diabetikern – im Vergleich zur Kontrollgruppe - sowohl quantitativ als auch qualitativ signifikant weniger oxidiert (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p<0,001$; HNA1: $p<0,001$; HNA2: $p= 0,003$).

	Häufigkeit	Prozent
GK Blutung	11	34,43%
Makulaloch	2	6,25%
ErM	14	43,75%
Synchisis	1	3,22%
Vitreous traction	4	12,50%
Gesamt	32	100,0%

Tabelle 21: Aufschlüsselung der Diagnosen innerhalb der Diabetesgruppe

Oxidativer Stress im Glaskörper

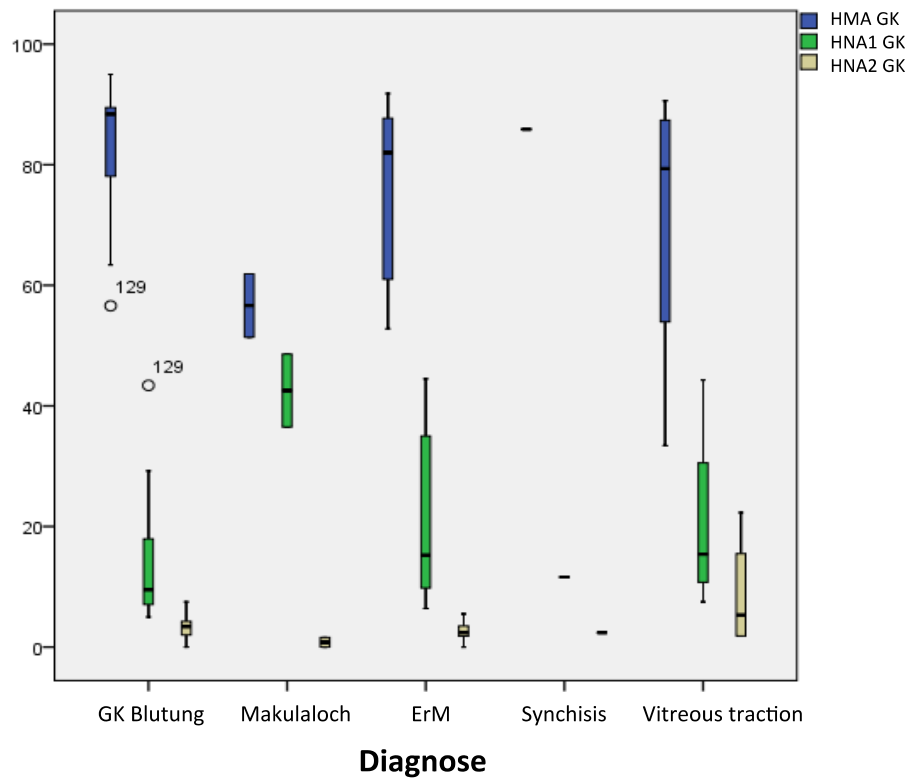


Abbildung 15: Graphische Darstellung der verschiedenen Albuminfraktionen unter Berücksichtigung der Indikation für die Vitrektomie (alle GK Blutungen sind proliferative diabetische Retinopathien)

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	Diagnose	GK Blutung	82,09	88,40	56,60	95,00	12,31
		Makulaloch	56,65	56,65	51,40	61,90	7,42
		ErM	75,58	82,00	52,80	91,80	14,38
		Synchisis	85,90	85,90	85,90	85,90	.
		Vitreous traction	70,68	79,35	33,40	90,60	25,72
HNA1 GK	Diagnose	GK Blutung	14,79	9,50	5,00	43,40	12,10
		Makulaloch	42,55	42,55	36,50	48,60	8,56
		ErM	21,89	15,25	6,40	44,50	14,22
		Synchisis	11,60	11,60	11,60	11,60	.
		Vitreous traction	20,65	15,40	7,50	44,30	16,24
HNA2 GK	Diagnose	GK Blutung	3,15	3,40	0,00	7,50	2,16
		Makulaloch	0,80	8,80	0,00	1,60	1,13
		ErM	2,56	2,40	0,00	5,50	1,33
		Synchisis	2,40	2,40	2,40	2,40	.
		Vitreous traction	8,68	5,30	1,80	22,30	9,64

Tabelle 22: Tabellarische Aufschlüsselung der verschiedenen Albuminfraktion innerhalb der Diabetesgruppe unter Berücksichtigung der Operationsindikation.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Im Gegensatz zu den Albuminfraktionen im GK konnten im Plasma keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Diabetesgruppe festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p=0,075$; HNA1: $p=0,075$; HNA2: $p=0,941$). Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 16 und eine tabellarische Auflistung der relativen Werte in Tabelle 23.

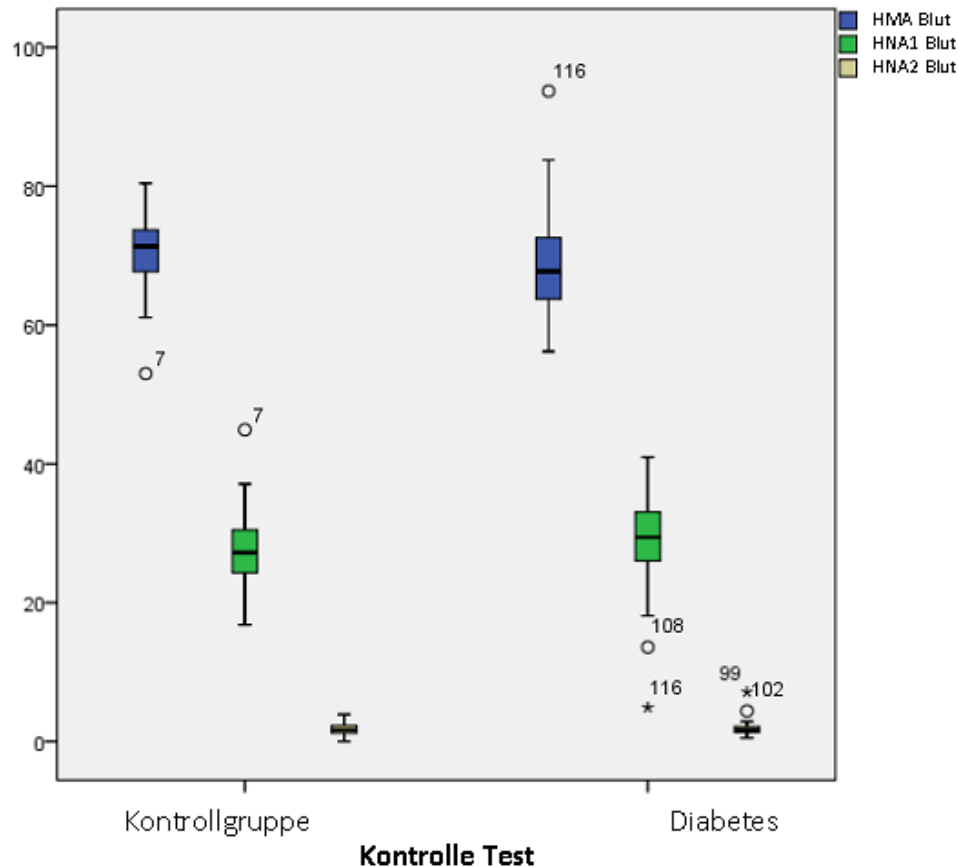


Abbildung 16: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt nach Diabetesstatus

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	70,86	71,30	53,00	80,40	±4,84
		Diabetes	69,15	67,75	56,20	93,70	±7,84
HNA1 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	27,30	27,20	16,80	44,90	±4,84
		Diabetes	28,90	29,45	4,90	41,00	±7,58
HNA2 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	1,83	1,70	0,00	3,90	±0,85
		Diabetes	1,95	1,65	0,50	7,13	±1,22

Tabelle 23: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt nach Diabetesstatus

Oxidativer Stress im Glaskörper

Beim Vergleich der Albuminfraktionen zwischen Plasma und GK bei Diabetes-PatientInnen fiel auf, dass das GK Albumin signifikant weniger oxidiert war (Wilcoxon-Vorrangzeichentest bei verbundenen Stichproben: HMA: $p=0,013$; HNA1: $p=0,004$; HNA2: $p=0,015$)

Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Albuminfraktionen aus Plasma und GK ist Tabelle 24 zu entnehmen.

	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	76,34	82,75	33,40	95,00	15,67
HMA Plasma	69,15	67,75	56,20	93,70	7,84
HNA1 GK	20,26	13,90	5,00	48,60	14,36
HNA1 Plasma	28,90	29,45	4,90	41,00	7,58
HNA2 GK	3,41	2,55	0,00	22,30	3,96
HNA2 Plasma	1,95	1,65	0,50	7,13	1,22

Tabelle 24: Gegenüberstellung der Albuminfraktionen aus GK und Plasma von Diabetes Patienten

5.2.4.8 Gruppenvergleich Kontrollgruppe vs. Amotio

Es wurden insgesamt 7 PatientInnen mit einer Netzhautablösung (Amotio) in die Studie eingeschlossen. Bei allen PatientInnen war die Netzhautabhebung bis über die Makula hinweg fortgeschritten. Die Albuminfraktionen des GK sind in Tabelle 25 und in Abbildung 17 abgebildet, jene des Plasma in Tabelle 26 und in Abbildung 18.

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	Gruppe	Kontrollgruppe	64,03	63,50	37,80	91,40	±13,07
		Amotio	71,74	74,40	55,70	88,10	±11,27
HNA1 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	30,67	29,70	6,70	54,70	±11,54
		Amotio	21,33	19,50	9,60	39,60	±9,69
HNA2 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	5,31	4,00	0,00	24,00	±4,49
		Amotio	6,93	4,90	2,30	14,20	±4,38

Tabelle 25: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	70,86	71,30	53,00	80,40	±4,84
		Amotio	69,90	71,00	57,20	77,00	±6,16
HNA1 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	27,30	27,20	16,80	44,90	±4,84
		Amotio	28,06	26,70	20,30	41,10	±6,46
HNA2 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	1,83	1,70	0,00	3,90	±0,85
		Amotio	2,04	2,20	1,10	2,70	±0,52

Tabelle 26: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio

Für keine der Plasmafraktionen konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p < 0,831$; HNA1: $p < 0,898$; HNA2: $p = 0,283$).

Bei den GK Fraktionen war HNA1 signifikant niedriger gegenüber der Kontrollgruppe - HMA und HNA2 unterschieden sich nicht (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben; HMA: $p < 0,117$; HNA1: $p < 0,032$; HNA2: $p = 0,195$).

Oxidativer Stress im Glaskörper

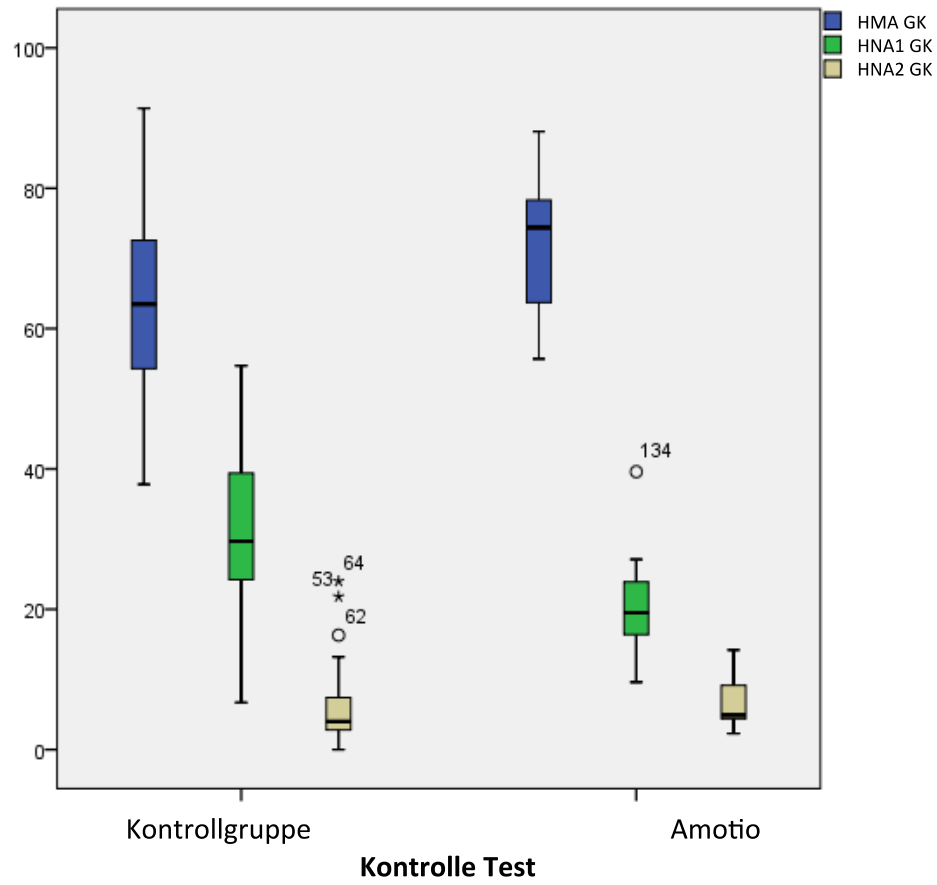


Abbildung 17: Albuminfraktionen des Glaskörpers unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio

Oxidativer Stress im Glaskörper

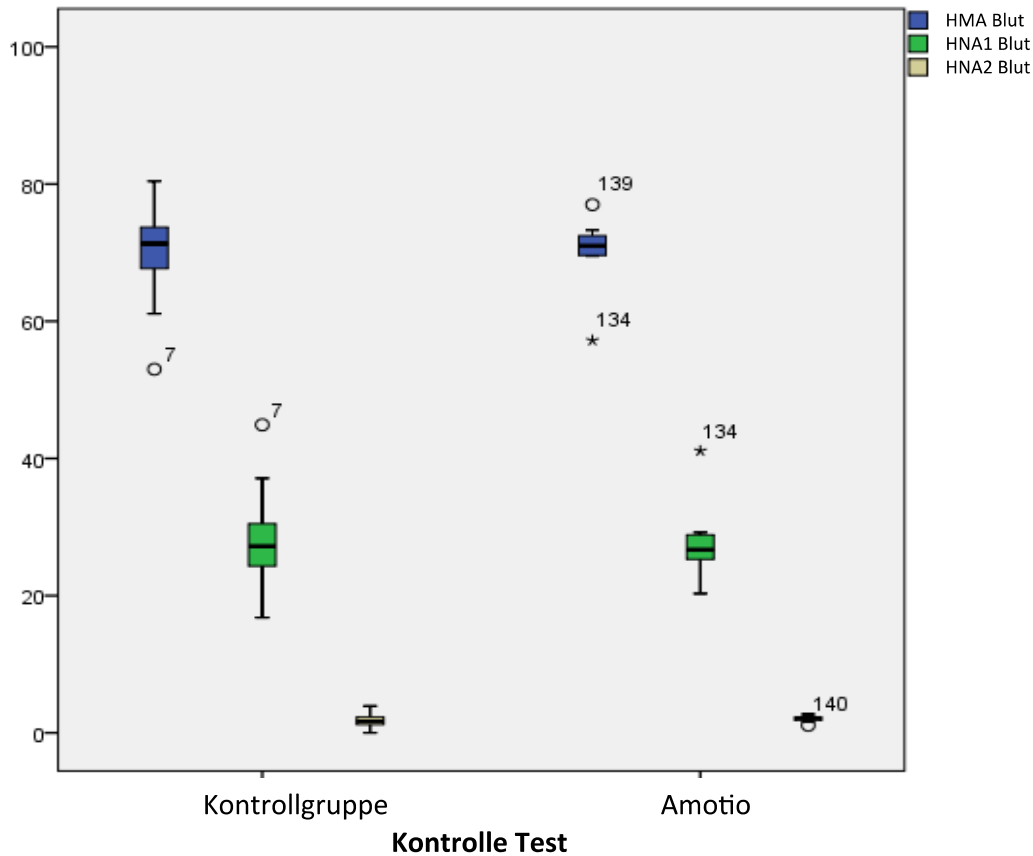


Abbildung 18: Albuminfraktionen des Plasma unter Berücksichtigung der Diagnose Amotio

5.2.4.9 Gruppenvergleich Kontrollgruppe vs. submakulärer Blutung

Es wurden insgesamt 3 PatientInnen mit einer submakulären Blutung in die Studie eingeschlossen. Bei allen PatientInnen war eine feuchte Makuladegeneration die Ursache der submakulären Blutung. Die Albuminfraktionen des GK sind in deskriptiver Art in Tabelle 27 und in Abbildung 19 abgebildet, jene des Plasma in Tabelle 28 und in Abbildung 20. Aufgrund der geringen PatientInnen Anzahl wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA GK	Gruppe	Kontrollgruppe	64,03	63,50	37,80	91,40	13,07
		Submakuläre Blutung	58,53	53,70	37,40	84,50	23,92
HNA1 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	30,67	29,70	6,70	54,70	11,54
		Submakuläre Blutung	36,73	40,60	14,80	54,80	20,28
HNA2 GK	Gruppe	Kontrollgruppe	5,30	4,00	0,00	24,00	4,49
		Submakuläre Blutung	4,77	5,70	0,80	7,80	3,59

Tabelle 27: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung

Oxidativer Stress im Glaskörper

			Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
HMA Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	70,86	71,30	53,00	80,40	4,84
		Submakuläre Blutung	72,53	71,30	70,40	75,90	2,95
HNA1 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	27,30	27,20	16,80	44,90	4,84
		Submakuläre Blutung	25,77	27,30	22,00	28,00	3,28
HNA2 Plasma	Gruppe	Kontrollgruppe	1,83	1,70	0,00	3,90	0,85
		Submakuläre Blutung	1,70	2,10	0,70	2,30	0,87

Tabelle 28: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung

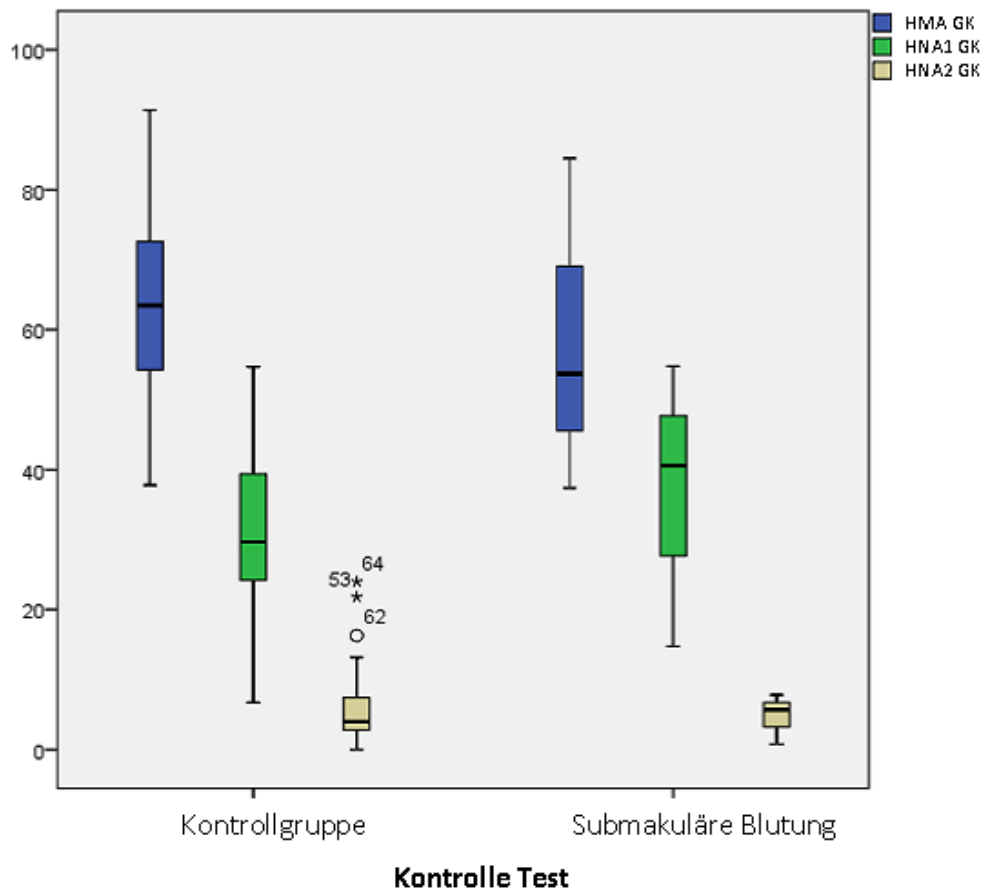


Abbildung 19: Albuminfraktionen des Glaskörpers aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung

Oxidativer Stress im Glaskörper

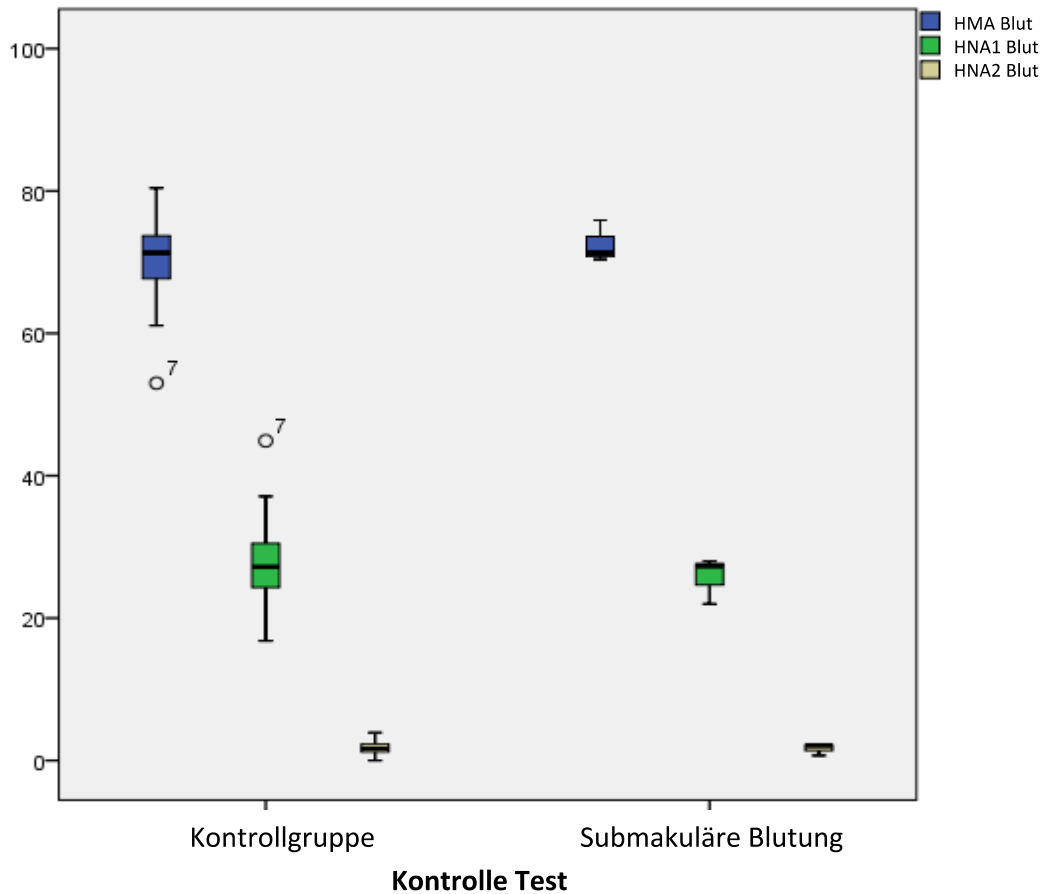


Abbildung 20: Albuminfraktionen des Plasma aufgeschlüsselt unter Berücksichtigung der Diagnose submakuläre Blutung

5.2.5 Ascorbinsäure im Glaskörper

Bei 93 PatientInnen wurde eine Konzentrationsbestimmung von ASC im Glaskörper durchgeführt (Tabelle 29).

Ascorbinsäure Glaskörper mmo/l					
Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
98	1,44	1,49	0,29	2,81	±0,66

Tabelle 29: Ascorbinsäure Konzentrationen im Glaskörper

Wie bei der Albuminkonzentration konnten auch bei der ASC Konzentration signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben $p=0,001$). Anders als bei der Albuminkonzentration war die ASC Konzentration bei Störungen der Blut-Retina-Schranke verringert (Vergleich: Abbildung 6). Eine graphische Darstellung der ASC Konzentrationen findet sich in Abbildung 21, eine detaillierte tabellarische Darstellung unter Tabelle 30.

Oxidativer Stress im Glaskörper

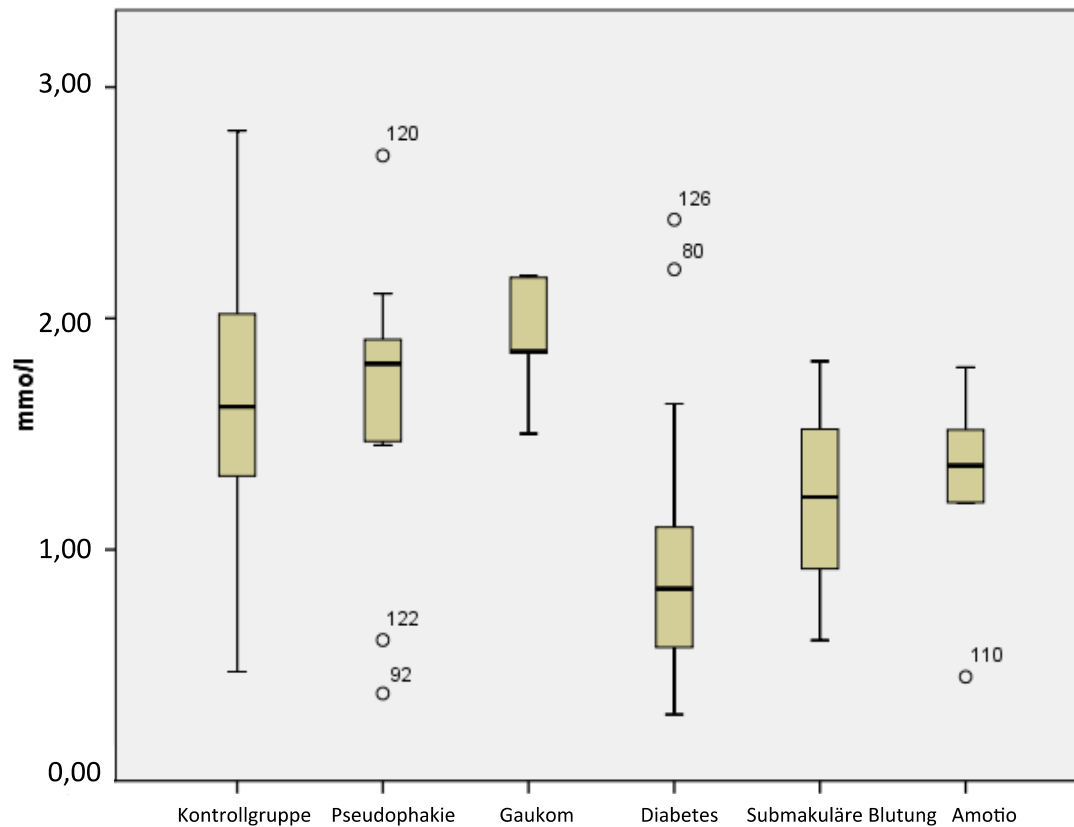


Abbildung 21: ASC Konzentrationen als Boxplot unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung

Zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen Pseudophakie (Mann-Whitney-U-Test: $p=0.897$), Glaukom (Mann-Whitney-U-Test: $p=0.161$) und Amotio (Mann-Whitney-U-Test: $p=0.118$) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Ascorbinsäure Konzentration festgestellt werden. Hingegen wies die Gruppe Diabetes eine signifikant niedrigere Ascorbinsäure Konzentration auf (Mann-Whitney-U-Test: $p<0.0001$). Auf eine statistische Analyse der Gruppe submakuläre Blutung wurde aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet.

	Ascorbinsäure mmol/l					
	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standardabweichung
Kontrollgruppe	43	1,65	1,62	0,47	2,81	$\pm 0,53$
Pseudophakie	11	1,62	1,80	0,38	2,70	$\pm 0,65$
Glaukom	5	1,91	1,86	1,50	2,18	$\pm 0,28$
Diabetes	25	,96	,83	0,29	2,43	$\pm 0,55$
Submakuläre Blutung	3	1,22	1,23	0,61	1,82	$\pm 0,60$
Amotio	6	1,28	1,36	0,45	1,79	$\pm 0,46$

Tabelle 30: ASC Konzentrationen unter Berücksichtigung der Gruppenstratifizierung

Oxidativer Stress im Glaskörper

Wie bereits angedeutet fiel ein Zusammenhang sowohl der ASC Konzentrationen als auch der Albumin Konzentrationen mit dem Vorhandensein von Blut-Retina-Schranken Störungen auf - eine signifikante, negative Korrelation (Spearman-Rang Koeffizient - 0,519; $p < 0,0001$). Eine graphische Darstellung des Zusammenhanges findet sich in Abbildung 22.

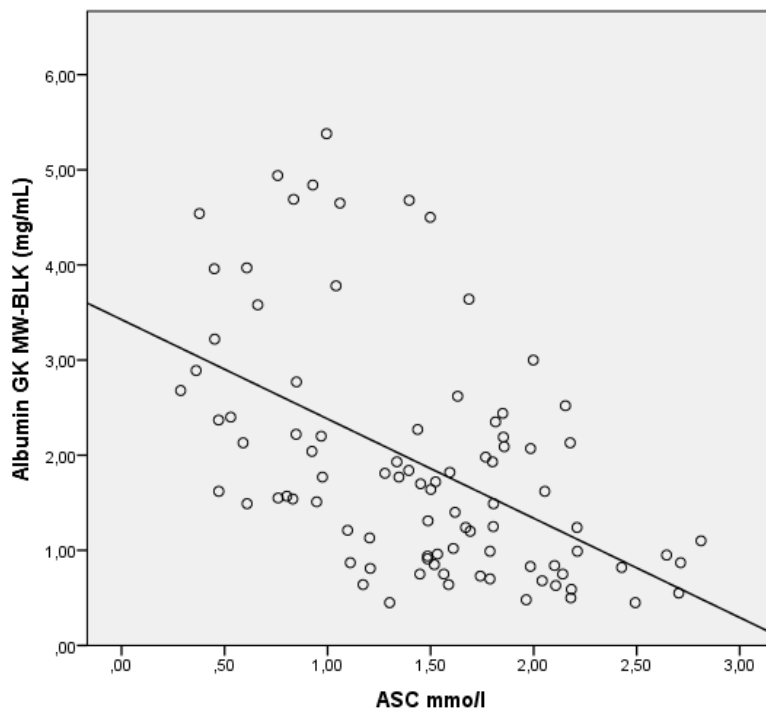


Abbildung 22: Zusammenhang Albumin und Ascorbinsäure Konzentration

Angesichts dieses Zusammenhanges ergibt sich folgende Fehler Gefahr: Bei ansteigender Albuminkonzentration und fallender ASC Konzentration könnte die antioxidative Komponente von Albumin jene von ASC ersetzen und eine falsche signifikante Korrelation darstellen. Um die ambivalente Rolle von ASC zu beleuchten, wurden deshalb in der weiteren Analyse nur GK Proben von PatientInnen herangezogen, welche keine (in der Literatur beschriebenen) Faktoren für oxidativen Stress aufwiesen – im Detail waren das 58 Patienten aus der Kontrollgruppe. Das Alter dieser PatientInnen war im Schnitt 71,75 (38-88±8.93) Jahre. Die Indikationen für die Vitrektomie waren wie folgt: Epiretinale Membran (ErM): 44 (73.3%), Makulaloch: 8 (13.3%), Vitreous Traction Syndrom: 5 (8,6%) und Synchisis 3 (5,0%) PatientInnen.

Eine Aufschlüsselung der Plasma- und GK- Albuminfraktionen sowie der ASC Konzentration aus dem GK findet sich in Tabelle 31.

Oxidativer Stress im Glaskörper

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standard Abweichung
Plasma Albumin Konzentration (g/dL)	3.50	4.70	4.17	±0.29
GK Albumin Konzentration (mg/mL)	0.45	5.38	1.59	±1.04
GK ASC Konzentration (mmol/L)	0.37	2.81	1.68	±0.52

Tabelle 31: Plasma- und Glaskörper Albumin-, sowie Ascorbinsäure (ASC) Konzentration.

Die Albumin Konzentrationen aus GK und Plasma korrelierten nicht ($p=0.199$) - auch die in Tabelle 32 aufgeschlüsselten und in Abbildung 23 als Boxplot dargestellten Albumin Fraktionen korrelierten nicht zwischen GK und Plasma (Spearman-Rang Korrelation: HMA: $p=0.204$; HNA1: $p=0.557$; HNA2: $p=0.08$).

	Min	Max	Mean	Standard Abweichung
GK HMA (%)	40.20	89.20	63.29	±13.16
GKHNA1 (%)	6.70	54.70	31.34	±11.86
GK HNA2 (%)	0.00	24.00	5.38	±4.64
Plasma HMA (%)	64.10	80.40	71.60	±4.28
Plasma HNA1 (%)	16.80	33.00	26.52	±4.35
Plasma HNA2 (%)	0.30	3.90	1.86	±0.89

Tabelle 32: Glaskörper (GK) and Plasma Albumin Fraktionen (humanes mercaptalbumin, HMA; human non-mercaptalbumin-1; HNA1; human non-mercaptalbumin-2, HNA2)

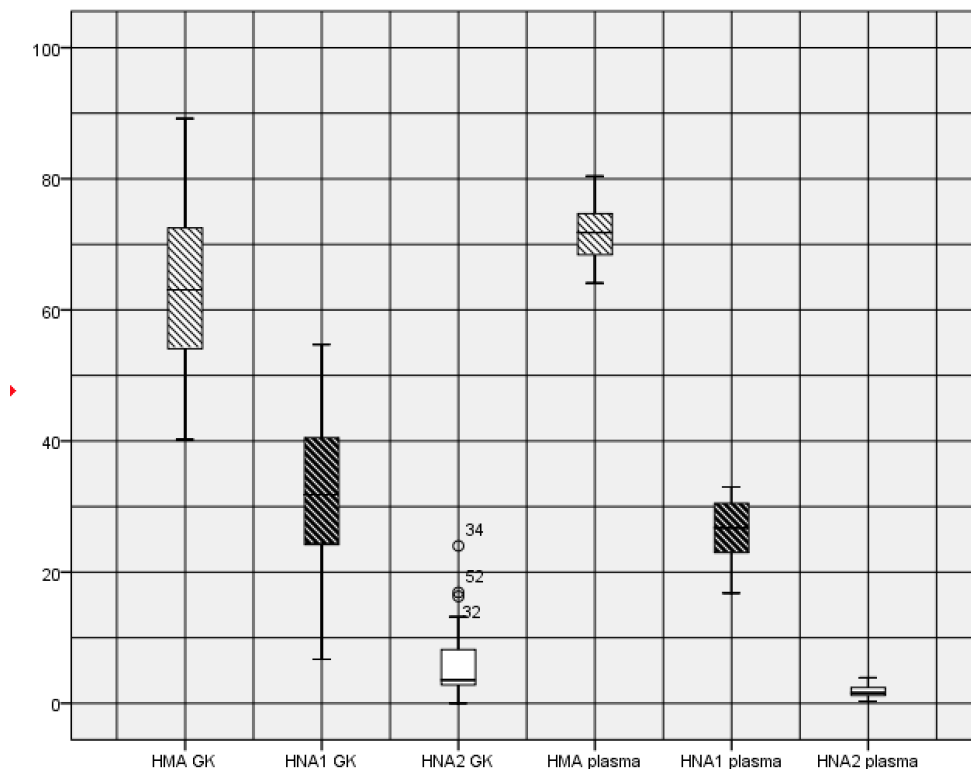


Abbildung 23: Glaskörper (GK) und Plasma Albumin Fraktionen dargestellt anhand eines box blots.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Das GK Albumin war signifikant höher oxidiert als das Plasmaalbumin (HMA: $p < 0.001$; HNA1: $p = 0.013$; HNA2: $p < 0.001$).

Es konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen der ASC Konzentration und den Albumin Fraktionen HMA und HNA1 festgestellt werden: HMA korrelierte negativ mit der ASC Konzentration, wohingegen HNA1 positiv mit der ASC Konzentration korrelierten. Für HNA2 konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Eine tabellarische Darstellung der Korrelationen findet sich unter

Tabelle 33, eine graphische unter den Abbildung 24-Abbildung 26.

			ASC mmol/l
Spearman-Rho	HMA GK	Korrelationskoeffizient	-0,534**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	58
	HNA1 GK	Korrelationskoeffizient	0,514**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	58
	HNA2 GK	Korrelationskoeffizient	0,154
		Sig. (2-seitig)	0,249
		N	58

Tabelle 33: : Korrelationen Zwischen Ascorbinsäure (ASC) Konzentration und Albuminfraktionen

Oxidativer Stress im Glaskörper

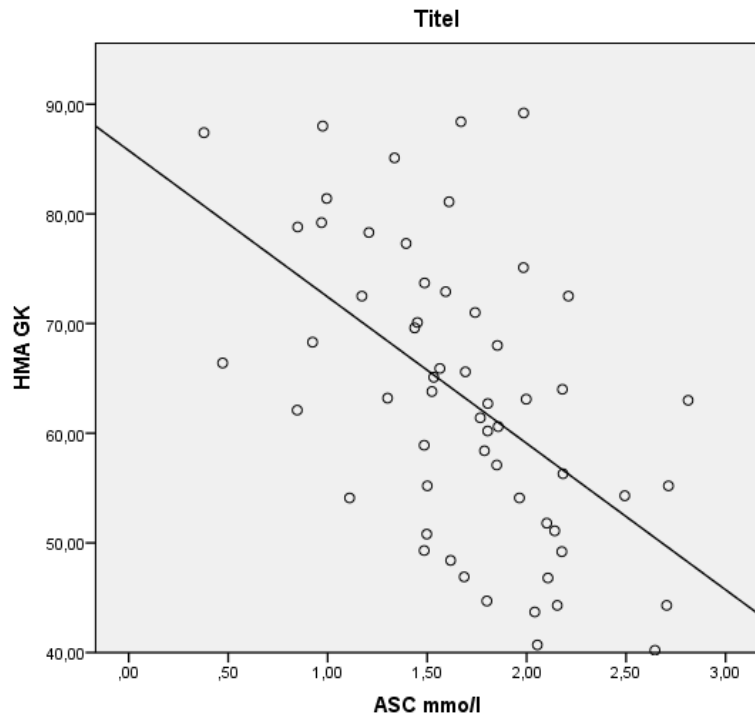


Abbildung 24: Korrelation zwischen GK - human mercaptalbumin (Vitreous HMA) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)

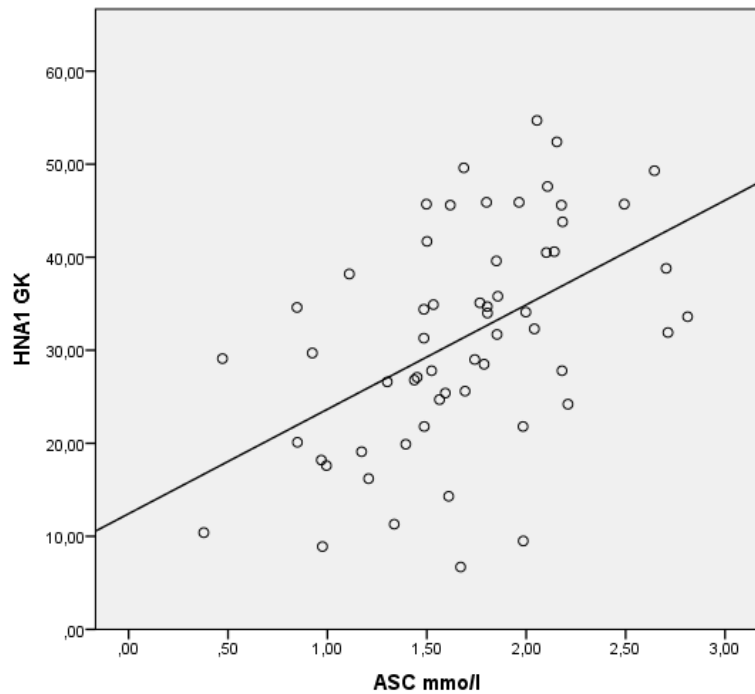


Abbildung 25: Korrelation zwischen GK - non human mercaptalbumin1 (Vitreous HNA1) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)

Oxidativer Stress im Glaskörper

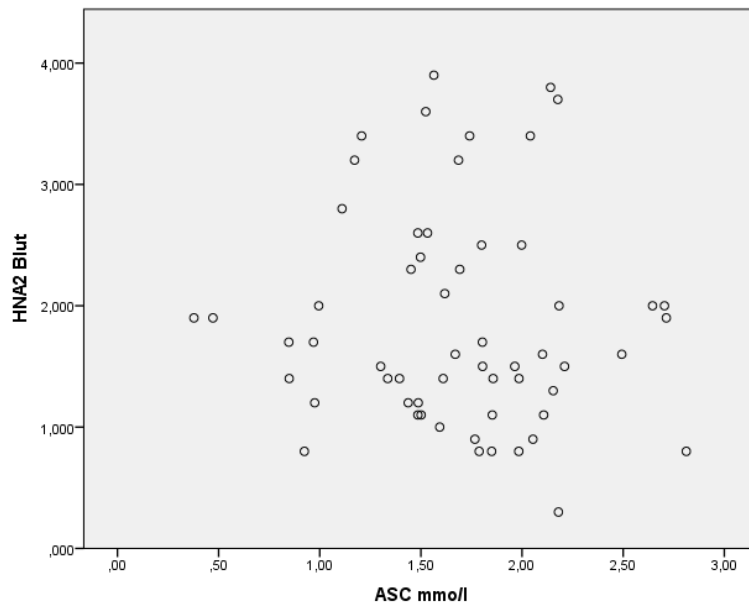


Abbildung 26: Korrelation zwischen GK - non human mercaptalbumin2 (Vitreous HNA2) und Ascorbinsäure Konzentration (ASC)

5.3 Diskussion

ROS entstehen als Folge von Stoffwechselprozessen aus molekularem Sauerstoff. ROS sind kurzlebige Molekülfragmente (beispielsweise das Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}$), welche bei einer Reihe von zellbiologischen Prozessen (z.B.: bei Signalübermittlungen oder Immunabwehr) eine wichtige, physiologische Rolle spielen. ROS können bei übermäßigem Auftreten jedoch auch Zellkomponenten wie DNA, RNA, Proteine oder Lipide schädigen. Um diese Schädigungen zu verhindern ist der Körper bzw. seine Zellen in der Lage, Substanzen zu produzieren/speichern, welche ROS neutralisieren können. Hierzu zählen Enzyme (wie z.B.: die Glutathionperoxidase - siehe Abbildung 4) oder Radikalfänger – reduzierende Substanzen welche bei der Reaktion mit einem ROS oxidiert werden (wie z.B.: ASC). Kommt es in einem biologischen System zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen ROS und Antioxidantien spricht man von oxidativem Stress – Schäden an Zellbestandteilen können nicht mehr suffizient verhindert werden. (32,34,38,48,53,56-59,61,71-75)

ASC ist im GK in hoher Konzentration anzutreffen – rund 10fach höher (GK: 0,4mmol/Kg) verglichen mit dem Plasma (0,04mmol/Kg). (3,12)

Bis vor kurzem wurde ASC im GK in zahlreichen Studien vor allem eine antioxidative Rolle zugeschrieben. (57,64,76) Rezentere Studien konnten jedoch zeigen, dass ASC auch eine entscheidende Rolle bei der Sauerstoffelimination spielt. Bei dieser Reaktion entsteht H_2O_2 – ein Oxidant; ASC hat im GK somit eine ambivalente Rolle – sowohl als Anti- als auch als Prooxidant. (5,12,18,21,22,31)

Viele Autoren – welche sich dem Auftreten von ROS im GK widmeten, beziehen sich auf die ASC Konzentration im GK. Dabei wurde eine niedrige ASC Konzentration mit einem vermehrten Auftreten von ROS und eine hohe ASC Konzentration vice versa mit einem erniedrigtem Auftreten assoziiert. (57,77-80) Aufgrund der neuen Erkenntnis, dass ASC im GK sowohl eine antioxidative als eine prooxidative Potenz besitzt, wird klar, dass ASC keine geeignete Variable ist, aus der man auf das Auftreten von ROS schließen kann. Ein neuer Marker welcher Rückschlüsse auf das Auftreten von ROS zulässt, ist Albumin. Albumin stellt im Serum das häufigste Protein und ein wichtiges Antioxidans dar. (79,81) Es kommt auch im GK vor, allerdings in wesentlich geringerer Konzentration. (14) Seine antioxidative Potenz spielt daher im GK eine untergeordnete Rolle.

Abhängig von seinem Redoxzustand sind drei Formen beschrieben: Mercaptalbumin (HMA)- die reduzierte Form, Nonmercaptalbumin 1 (HNA1)- die durch „milde“ Oxidation reversibel veränderte Form, und Nonmercaptalbumin 2 (HNA2)- welches

irreversibel, beispielsweise durch die Wirkung von H_2O_2 , entsteht. Der Redoxzustand von Albumin hat sich in der rezenten Literatur als guter Indikator für oxidativen Stress erwiesen, da es einen systemischen Zustand widerspiegelt, der gut quantifizierbar ist. (48,51-54) Speziell im GK wurde der Redoxzustand von Albumin noch nicht untersucht, erscheint aber für die Erforschung des Zusammenhangs zwischen Qualität und Quantität von ROS und dem Auftreten von Krankheiten des Augenninneren besonders interessant. Im Zuge dieser Arbeit wurde bei 140 PatientInnen sowohl das GK Albumin als auch das Plasmaalbumin hinsichtlich des Redoxstatus ausgewertet. Die PatientInnen wurden in 6 Gruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe und 5 Gruppen mit Erkrankungen, welche mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus wurde bei 58 GK aus der Kontrollgruppe auch die ASC Konzentration ausgewertet und mit dem Redoxstatus von Albumin abgeglichen.

16 GK mussten – um valide Daten zu erhalten - aus der Analyse ausgeschlossen werden. Bei einem GK wurde überraschender Weise intraoperativ ein entzündlicher Prozess festgestellt – dieser konnte vor der Operation aufgrund einer GK Blutung nicht diagnostiziert werden. GK Blutungen erschienen uns für unsere Analyse sehr interessant, da das im Hämoglobin enthaltende Metallion Fe^{2+} mit ASC reagieren kann und dabei ein sehr potenter Radikalbildner ist (siehe auch Abbildung 4). (7,26,82) Da jedoch auch Entzündungen mit einer vermehrten ROS Bildung einhergehen, hätten zwei verschiedene Faktoren auf den Redoxstatus des Albumin eingewirkt – eine Aussage, welcher dieser beiden Faktoren jeweils relevant ist, wäre nicht möglich gewesen. (56,79)

In Vorexperimenten (siehe nächstes Kapitel – Experiment 2) konnte ermittelt werden, dass die Analyse des GK Albumins innerhalb von 2 Stunden nach Gewinnung der GK Probe durchgeführt werden musste, da es andernfalls zu einer signifikanten Verschiebung der Albuminfraktionen gekommen wäre. Aufgrund unerwarteter Verzögerungen beim Transport vom Operationssaal der Augenklinik an das Institut für Physiologische Chemie mussten 4 GK ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Ausschlussgrund war der Kontakt der GK Probe mit Luft (Luft in der Spritze bzw. ein während des Transportes gelöster Deckel), da die Hypothese unserer Arbeit war, dass die Reaktion von Sauerstoff mit ASC freie Radikale produziert. Der unphysiologische direkte Kontakt des GK mit Luft (bzw. Sauerstoff) vor der Analyse hätte die Ergebnisse verfälschen können.

4 GK Proben konnten nicht analysiert werden, da entweder zu wenig Material gewonnen werden konnte oder weil die HPLC Analyse nicht funktioniert hatte.

Albuminkonzentrationen

Insgesamt konnten somit 140 GK analysiert und ausgewertet werden. Bevor nun näher auf die verschiedenen Albuminfraktionen eingegangen wird, scheint es interessant, einen genaueren Blick auf die Albumin Konzentrationen im Plasma und GK zu werfen. Albumin wird nämlich in der Leber synthetisiert und zirkuliert über den Blutkreislauf. (79)

Das Kammerwasser, welches vom Ziliarkörper produziert wird, ist ein Ultrafiltrat des Blutes. (18,79,83) Die Zusammensetzung des Kammerwassers unterscheidet sich vom Plasma sehr stark: Während Albumin beispielsweise in wesentlich geringerer Konzentration als im Plasma zu finden ist, übersteigt die ASC Konzentration jene des Plasma um das 100- fache. (17,75,79) Diese unterschiedliche Zusammensetzung ist wichtig, um die Transparenz des Kammerwassers zu gewährleisten und wird einerseits durch eine intakte Blutkammerwasserschranke und andererseits durch spezifische Transportmechanismen aufrechterhalten. (3,10)

Während das Kammerwasser vom Ziliarkörper durch die Pupille in den Kammerwinkel fließt, diffundieren Kammerwasserbestandteile wie Albumin oder ASC in den GK. (84) In unseren Auswertungen konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Plasma- und GK Albuminkonzentration gefunden werden. Würde man davon ausgehen, dass das Kammerwasser ein reines Ultrafiltrat des Blutes ist, und dass eine gleichmäßige Diffusion von Kammerwasseralbumin in den GK stattfindet, würde man eine solche Korrelation erwarten. So könnten zwei Faktoren diesen Effekt bewirken:

Zum einen die Modifizierung des Blutultrafiltrates zu Kammerwassers. Dies erscheint sehr wahrscheinlich, da – speziell für unsere Arbeit wichtig – beispielsweise auch die ASC Konzentration über aktive Transportmechanismen in das Kammerwasser geregelt wird. So erscheint es durchaus denkbar, dass auch die Albuminkonzentration im Kammerwasser über aktiven Transport vor sich geht. (83,84) Niedrige Eiweißkonzentrationen im Kammerwasser sind entscheidend, um die Transparenz dieses Mediums zu gewährleisten. Beispiel: Klinisch erkennt man hohe Eiweiß Konzentrationen bei einem Zusammenbruch der Blutkammerwasserschranke am Tyndalleffekt – die im Kammerwasser enthaltenen Proteine bewirken eine sogenannte „Mie Streuung“ wodurch der Lichtstrahl sichtbar wird. (81)

Der zweite mögliche Einflussfaktor ist die Inhomogenität des GK. Der GK wird von einer Grenzmembran umgeben – einer Kondensation von Kollagenfasern. Diese Membran grenzt den GK vom Kammerwasser ab und stellt somit eine Diffusionsbarriere dar. (3,10,11,84) Es ist naheliegend, einen Zusammenhang zwischen der Albuminkonzentration im GK und den Ausprägungen bzw. Eigenschaften dieser Diffusionsbarriere zu vermuten.

Albuminfraktionen

In unserer Studie wurde neben dem GK Albumin auch das Plasmaalbumin analysiert. PatientInnen mit Leber- und/oder Nierenerkrankungen (dialysepflichtiges Nierenversagen) wurden in unserer Studie ausgeschlossen da diese Erkrankungen in der Literatur mit signifikant höheren Fraktionen des oxidierten Plasma Albumin einhergehen. (50,51,55) Das GK Albumin entstammt dem Plasma – wäre bereits ein Großteil des Albumin bereits bei der Sekretion in das Auge oxidiert, wäre es nicht möglich gewesen, Prozesse darzustellen, welche mit einem besonders hohen Auftreten von ROS einhergehen. Aus diesem Grund wurden die oben genannten Erkrankungen ausgeschlossen, sodass wir in unserer Studie einen möglichst hohen nicht reduzierten Plasmaalbuminanteil auffinden konnten.

Beim Vergleich der Albuminfraktionen aller PatientInnen (ohne etwaige Einflussfaktoren zu berücksichtigen) fiel auf, dass im GK signifikant weniger HMA und mehr HNA1 als im Plasma zu finden war – die HNA2 Konzentration unterschied sich nicht. Dieses Ergebnis war für unsere Studie besonders interessant, da es zeigt, dass im GK chemische Prozesse ablaufen, welche dazu führten, dass signifikant mehr Albumin oxidiert ist.

Um bei der weiteren Auswertung etwaige Einflussfaktoren (Erkrankungen/Faktoren, welche in der rezenten Literatur mit dem vermehrten Auftreten von ROS in Verbindung gebracht wurden) zu berücksichtigen, wurde die bereits erwähnte Gruppeneinteilung durchgeführt.

Zunächst wurde eine Kontrollgruppe definiert. Im Detail handelt es sich um die Diagnosen Epiretinale Membran, Vitreous traction, Makula Löcher und Synchisis. Die anderen fünf Gruppen, wurden in folgenden Faktoren stratifiziert: Pseudophakie, Glaukom, Diabetes, submakuläre Blutung (im Rahmen einer altersbedingten Makuladegeneration) und Amotio. Dabei wurde darauf geachtet, dass in einem Individuum bzw. Auge nur ein Faktor vorlag: Es war zum Beispiel kein pseudophakes

Auge in der Glaukomgruppe oder kein Diabetiker in der Amotio-Gruppe. So wurden etwaige überschneidende Einflüsse auf den Oxidationsstatus von Albumin vermieden.

Albuminkonzentrationen zwischen den Gruppen

Beim Vergleich der GK Albuminkonzentrationen fiel auf, dass speziell in der Diabetesgruppe und bei submakulären Blutungen erhöhte Albuminkonzentrationen vorlagen. Beiden Gruppen ist eine Störung der Blut-Retina-Schranke gemein. Es scheint daher naheliegend, die Störung der Blut-Retina-Schranke für die vergleichsweise hohe Albumin Konzentration im GK als Erklärung heranzuziehen. Auf der anderen Seite würde man sich ein ähnliches Phänomen bei der Amotio-Gruppe (alle Fälle waren rheumatogene Amotio-nes) erwarten, da auch hier die Blut-Retina-Schranke (durch Netzhautrisse, welche mit Gefäßschädigungen einhergehen) gestört ist. Da dem nicht so war, vermuten wir, dass die zerrissenen Netzhautgefäße offensichtlich rasch thrombosieren und so ein weiteres Austreten von Blut bzw. Albumin in den GK verhindert wird.

Albuminfraktionenvergleich zwischen GK und Plasma

Neben der Albuminkonzentration unterschieden sich auch die HMA und HNA1 Albuminfraktionen (– in der Analyse aller GK Proben) zwischen dem GK und dem Plasma signifikant – kein signifikanter Unterschied konnte für HNA2 gefunden werden. Im Detail war im GK ein höherer Anteil des Albumins oxidiert. Dieses Ergebnis war von entscheidender Bedeutung für unsere Studie, da es den Schluss nahe legte, dass Prozesse im GK ablaufen, welche mit einer ROS Produktion in Verbindung stehen. Ob diese Prozesse auf bestimmte Faktoren/Erkrankungen zurückzuführen waren soll im Folgenden diskutiert werden. Die 140 ermittelten GK Proben wurden in eine Kontrollgruppe und 5 Gruppen stratifiziert, welche in der Folge verglichen wurden. In die Kontrollgruppe wurden nur GK Proben von Vitrektomien eingeschlossen, deren zugrundeliegende Erkrankungen in der Literatur nicht mit dem Auftreten von ROS in Verbindung gebracht wurden.

Es steht außer Frage, dass die idealen GK Proben von gesunden Menschen stammen würden – die Gewinnung solcher Proben stellt sich jedoch aus ethischer Sicht als höchst problematisch dar. An dieser Stelle sei auch erwähnt, dass GK Proben aus Leichenaugen nicht geeignet gewesen wären da der Tod eines Menschen den Redoxzustand des Albumins ebenfalls beeinflusst. (54)

Bevor auf die Gruppenvergleiche eingegangen wird, soll zuerst die Kontrollgruppe diskutiert werden.

Kontrollgruppe

Wie beim Vergleich der Albuminfraktionen zwischen Plasma und GK konnte auch in der selektierten Kontrollgruppe gezeigt werden, dass ein höherer Albuminanteil im GK – verglichen mit dem Plasma - oxidiert war. Interessanterweise traf dies in diesem Fall auch für HNA2 zu. Daraus schließen wir, dass im (annähernd) gesunden GK physiologischerweise ROS produziert werden.

In der Folge wurden die Albuminfraktionen der verschiedenen Vitrektomie Indikationen innerhalb der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass eine Erkrankung/Faktor in diese Gruppe eingeschlossen wurde, welche (unbekannter weise) doch mit oxidativem Stress in Verbindung steht. Dies konnte durch statistische Tests sowohl für die GK- als auch die Plasmaalbuminfraktionen ausgeschlossen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Kontrollgruppe durch Selektion eine sehr homogene, repräsentative Gruppe darstellt, welche einer idealen Kontrollgruppe (bestehend aus gesunden GK Proben) möglichst nahe kommt. Dies ist für die Analysen, welche innerhalb der Kontrollgruppe durchgeführt wurden, und die später folgenden Gruppenvergleiche von besonderer Bedeutung.

Analysen innerhalb der Kontrollgruppe

Wie bereits diskutiert, stellten die GK Proben der Kontrollgruppe eine gute Annäherung an gesunde GK Proben dar. Aus diesem Grund wurden diese Daten für weitere Analysen herangezogen.

Alter und Albuminfraktionen innerhalb der Kontrollgruppe

Eine interessante Fragestellung war, ob das Alter einen Einfluss auf den Redoxstatus von Albumin hatte. Bereits 1956 stellte der Biogerontologe Denham Harman die These auf, dass ROS als Nebenprodukt des physiologischen Stoffwechsels in Zellen bzw. Zellbestandteile und Erbgut schädigen. Der „Theorie der freien Radikale“ zufolge stellt die lebenslange Akkumulation von ROS bedingten Schädigungen einen Teil des Alterungsprozesses dar. (34,36,37)

Tatsächlich konnten wir für das Plasma eine hochsignifikante Korrelation zwischen Alter und Zunahme von HNA1 bzw. Abnahme von HMA (nicht jedoch für HNA2)

feststellen. Im GK konnte keine entsprechende Alterskorrelation für HMA bzw. HNA1 detektiert werden; Hingegen nahm HNA2 mit zunehmendem Alter ab.

Im Gegensatz zum Plasmaalbumin welches mit zunehmendem Alter vermehrt oxidiert wurde, konnte für das GK Albumin keine altersbezogene Korrelation gezeigt werden. Möglicherweise ist die fehlende Alterskorrelation des GK Albumins ein Hinweis dafür, dass die Prozesse welche die oben beschriebenen oxidativen Veränderungen des GK Albumins bewirken, mit zunehmendem Alter zum Erliegen kommen.

Unter der Annahme dass die prooxidative Eigenschaft des GK auf den O₂ Abbau zurückzuführen ist, ergibt sich ein schlüssiges Bild: Ein niedriger O₂ Partialdruck ist wichtig, um eine Katarakt- und Glaukom Entstehung zu verhindern. Für diese beiden Erkrankungen gilt das Alter als hoher Risikofaktor. Kommt mit zunehmendem Alter der O₂-Abbau im GK zum Erliegen, entstehen nicht nur weniger ROS, welche Albumin oxidieren können, sondern es kommt auch zu den zuvor beschriebenen Folgen.

GK Status und Albuminredoxstatus

Wie gerade angesprochen, war die unserer Studie zu Grunde liegende Hypothese, dass die Produkte des ASC-abhängigen Sauerstoffabbaus zu einer vermehrten Oxidation des GK Albumins führen. In rezenten Studien konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffabbau mit zunehmender Abnahme der GK Viskosität abnimmt. (22) Für die Analyse der GK Viskosität stand in unserer Studie zu wenig Material zu Verfügung, sodass als indirekter Parameter hierfür der GK Status herangezogen wurde. Zahlreiche Studien konnten einen direkten Zusammenhang zwischen GK Verflüssigung und GK Abhebung demonstrieren. (3,10,23,85) Der GK Status wurde intraoperativ erhoben und in „anliegender GK“, „partiell abgehobener GK“ und „abgehobener GK“ eingeteilt. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Redoxstatus des GK Albumins ermittelt werden. Unter der Annahme, dass die Albuminoxidation im GK auf den Anfall von ROS im Zuge des O₂-Abbaus zurückzuführen ist, stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu jenen aus der angesprochenen Studie. (21) Die Autoren dieser Studie (21) schlossen jedoch ein sehr heterogenes Patientengut ein – so wurden beispielsweise GK Proben von PatientInnen mit diabetischer Retinopathien, Amotiones zusammen mit Makulalöchern und Epiretinaler Membranen analysiert. Hieraus ergibt sich ein möglicher Bias denn – wie in unserer Studie weiter unten beschrieben – auch die Blut-Retina-Schranke ist ein wichtiger Einflussfaktor auf die GK ASC Konzentration. Ein Zusammenbrechen der Blut-Retina-Schranke führt nämlich zu einer verminderten GK

ASC Konzentration. (64,77,83,86) Dieser Umstand wurde in unserer, nicht jedoch in der zitierten Studie berücksichtigt und erklärt vielleicht diese widersprüchlichen Ergebnisse.

Pseudophakie und Albuminredoxstatus

Pseudophakie wurde mit einer Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes - v.a. bei vitrektomierten Augen in Verbindung gebracht. (4) Beim Vergleich der Albuminfraktionen zwischen der Kontrollgruppe und der Pseudophakiegruppe konnten jedoch weder für den GK noch für das Plasma signifikante Unterschiede aufgezeigt werden. Alle PatientInnen dieser Gruppe waren bereits vor der Vitrektomie pseudophak. Die Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes wurde in der oben angesprochenen Studie bei Augen gemessen, welche bereits sowohl pseudophak als auch vitrektomiert waren. In der Zusammenschau mit unseren Ergebnissen gehen wir daher davon aus, dass nicht die Pseudophakie alleine sondern die Kombination aus Vitrektomie und Kataraktoperation einen relevanten biochemischen Einfluss auf das Auge hat. In Hinblick auf weitere Studien erscheint uns daher die Albuminanalyse von Augen, welche bereits pseudophak und vitrektomiert sind, interessant.

Glaukom und Albuminredoxstatus

Zahlreiche Studien assoziieren die Erkrankung „Glaukom“ mit oxidativem Stress – sowohl im vorderen als auch im hinteren Augenabschnitt. (4,76,87) Auch unsere Ergebnisse untermauern die Assoziation im hinteren Augenabschnitt. Während für das Plasmaalbumin zwischen Kontrollgruppe und Glaukomgruppe keine signifikante Unterschiede vorlagen, war der oxidierte Albuminanteil HNA1 im GK signifikant höher – dementsprechend war das HMA anteilmäßig reduziert. Keine Unterschiede konnten für HNA2 festgestellt werden.

Im hinteren Augenabschnitt wird die Ganglienzellapoptose beim Glaukom mit vermehrtem Auftreten von ROS in Verbindung gebracht. Die Ganglienzellschicht ist vom GK nur durch die hauchdünne Membrana limitans interna getrennt. So erscheint es naheliegend, dass die entstandenen ROS auch auf den GK bzw. das GK Albumin wirken. (76)

Eines sei an dieser Stelle bereits vorweggenommen: die ASC Konzentration dieser Gruppe unterschied sich nicht von PatientInnen aus der Kontrollgruppe, sodass davon

ausgegangen werden muss, dass das gehäufte Auftreten von ROS nicht mit der ASC Konzentration in Zusammenhang steht.

Neben den Auswirkungen auf das Albumin ist es darüber hinaus durchaus denkbar, dass auch der GK selbst durch die ROS verändert wird. Im Detail gingen wir davon aus, dass sich der GK durch die ROS Depolymerisierung von Hyaluronsäure verflüssigt bzw. in der Folge eine GK Abhebung resultiert. (7,33) Diese Idee wurde gesondert untersucht und lieferte interessante klinisch relevante Ergebnisse, auf die jedoch erst im letzten Teil (Klinische Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf den Glaskörper am Beispiel Glaukom) der Arbeit eingegangen wird.

Diabetes und Albuminredoxstatus

Eine weitere Erkrankung, bei der das Auftreten von ROS eine Rolle spielt, ist Diabetes mellitus. (84,88) Entgegen unseren Erwartungen war das Albumin im GK von betroffenen PatientInnen signifikant – sowohl quantitativ als auch qualitativ – weniger oxidiert. Auch unter Berücksichtigung des Stadiums (proliferative vs. nicht proliferative diabetische Retinopathie) änderte sich dieses Ergebnis nicht.

Wir führen dieses Ergebnis auf die verminderte ASC Konzentration im GK von Diabetikern zurück – diese ist nicht nur in der Literatur beschrieben, sondern konnte auch in unserer Studie demonstriert werden. (88-90)

Es wird angenommen, dass für die Aufrechterhaltung der hohen ASC Konzentration im GK eine intakte, innere Blut-Retina-Schranke notwendig ist. (83,84,86,91) Kommt es zu Störungen der Blut-Retina-Schranke, kann ASC entlang des Konzentrationsgefälles aus dem GK in das Blut diffundieren. Unter der Annahme dass ASC im GK vor allem prooxidative Eigenschaften besitzt, kann dadurch schlüssig erklärt werden, weshalb Albumin im GK vermehrt in reduzierter Form vorlag. Diese These bedarf jedoch weiterer Forschungsarbeit.

Das Plasmaalbumin der Diabetesgruppe unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe. Letzteres steht im Gegensatz zur den Daten aus der Literatur, in welchem durchaus ein höherer oxidiertes Albuminanteil im Plasma von Diabetikern beschrieben wird. (55) Im Gegensatz zur erwähnten Studie wurden in unserer Studie keine dialysepflichtigen PatientInnen eingeschlossen. Möglicherweise lässt dies den Schluss zu, dass das Albumin bei Diabetikern nicht primär wegen der gestörten Stoffwechsellage sondern aufgrund der Niereninsuffizienz vermehrt oxidiert ist.

Besonders interessant war, dass bei der Diabetesgruppe das Albumin im GK weniger oxidiert war als jenes aus dem Plasma – dies war bei der Kontrollgruppe nicht der Fall. Es ist davon auszugehen, dass die ASC bedingten Prozesse aufgrund der niedrigen ASC Konzentration bei Diabetes mellitus PatientInnen nicht mehr im Gange sind – d.h. eine Oxidierung des Albumins findet nicht mehr statt. Man würde also erwarten, dass der Redoxstatus von Albumin jenem des Plasmas sehr ähnelt. Allerdings ist das GK Albumin bei Diabetes Mellitus PatientInnen in unserer Studie weniger oxidiert als im Plasma – obwohl das GK Albumin dem Plasma entstammt. Man könnte dies so deuten, dass im GK pro- und antioxidative Faktoren vorherrschen. Sinkt die ASC Konzentration überwiegen die antioxidativen Faktoren welche zu einer Reduktion des Albumins führen. Dies scheint auch hinsichtlich eines körpereigenen Protektionsmechanismus interessant: Durch das Sinken der ASC Produktion wird weniger Sauerstoff abgebaut – dies könnte der gestörten/verminderten retinalen Versorgung positiv entgegenwirken. Ebenso die nun überwiegenden antioxidativen Eigenschaften – es ist bekannt, dass die Netzhaut bei der diabetischen Retinopathie auch durch oxidativen Stress geschädigt wird. Möglicherweise wären diese Schäden noch ausgeprägter wenn die ASC Konzentration im GK nicht sinken würde.

Amotio und Albuminredoxstatus

Zwar nicht so ausgeprägt, aber ähnlich wie bei der Diabetesgruppe fiel das Ergebnis für die Amotiogruppe aus: Es war signifikant weniger HNA1 im GK von PatientInnen mit einer Netzhautablösung verglichen mit der Kontrollgruppe zu finden. HMA1 und HNA2 des GK und sämtliche Albuminfraktionen des Plasmas unterschieden sich hingegen nicht.

Auch bei der Amotio kommt es einerseits zu einem vermehrten Anfall von ROS und zu einer Störung der Blut-Retina-Schranke(84,92-94)einerseits durch die Freilegung des retinalen Pigmentepithels und andererseits durch die Ruptur retinaler Gefäße. Geht man davon aus, dass die tight junctions des retinalen Pigmentepithels von der Amotio nicht betroffen sind, zeichnet sich ein ebenfalls schlüssiges Bild ab: Offensichtlich ist für eine andauernd hohe ASC Konzentration im Auge vor allem die innere Blut-Retina-Schranke ausschlaggebend. Diese wird gebildet von Perizyten, welche um die retinalen Gefäße „geschlungen“ sind. Zu einem kleinen Teil wird die Blut-Retina-Schranke durch Ruptur von retinalen Gefäßen aufgehoben; zu einem viel größerem Teil jedoch durch die

gestörte Stoffwechsellage beim Diabetes mellitus, welche neben anderen Veränderungen einen Untergang der Perizyten zur Folge hat.

Wiederum kann - unter der Annahme, dass ASC im GK prooxidative Eigenschaften besitzt - schlüssig erklärt werden, weshalb das Albumin bei Diabetikern und Amotiones weniger oxidiert war.

Submakuläre Blutung und Albuminredoxstatus

Die feuchte Makuladegeneration wurde ebenfalls mit dem vermehrten Auftreten von ROS in Verbindung gebracht – das Risiko (zumindest für bestimmte PatientInnen) für eine Progression dieser Erkrankung kann durch die Einnahme hochdosierter Antioxidantien (vermutlich) vermindert werden. (95-97) Wir schlossen 3 PatientInnen in unserer Studie ein, welche aufgrund einer submakulären Blutung im Rahmen einer feuchten Makuladegeneration vitrektomiert wurden. Bei diesen PatientInnen war im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger HMA bzw. mehr HNA1 im GK zu finden. Aufgrund der Gruppengröße wurde jedoch auf eine weitere statistische Analyse verzichtet. Ob dieser Unterschied auf die gestörte Stoffwechsellage der Netzhaut zurückzuführen oder nur eine zufällige Erscheinung ist, konnte nicht unterschieden werden. Auch an dieser Stelle scheinen weitere Studien von Nöten.

ASC Konzentration und Albuminfraktionen

Bei 93 Personen wurde neben Albumin auch die ASC Konzentration der GK Probe gemessen.

Bei der Auswertung der ASC Konzentrationen fiel auf, dass die ASC Konzentrationen in der Diabetikergruppe und Amotiogruppe signifikant niedriger waren als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien welche ebenfalls erniedrigte GK ASC Spiegel bei Diabetikern nachweisen konnten(88-90) Der Schluss liegt nahe, dass die hohe ASC Konzentration im GK nicht nur durch den aktiven Transport in das Auge, sondern auch durch eine intakte Blut-Retina-Schranke aufrecht erhalten wird – dies wurde auch in der Literatur diskutiert(22,83,86) Gerade bei Diabetikern wird diese Schranke durch den Untergang von Perizyten (Zellen welche die retinalen Gefäße ummanteln) gestört. Zu dieser Vermutung passte auch, dass wir eine negative Korrelation zwischen der Albuminkonzentration und der ASC Konzentration im GK fanden: Wurde die Blut-Retina-Schranke durchlässig, konnte in der Folge auch mehr intravasales Albumin in den GK Raum austreten. (Ein Zusammenhang

zwischen der Albuminkonzentration im Plasma und im Blut konnte wie bei der ersten Analyse aller 140 GK ausgeschlossen werden). Trotzdem erreichte die GK Albuminkonzentration nicht annähernd jene Konzentrationen, welche im Plasma gefunden wurden.

Des Weiteren konnte bei der Auswertung aller ASC Daten - ohne Berücksichtigung der Stratifizierung - ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der ASC Konzentration und dem Redoxzustand von Albumin beobachtet werden: Mit zunehmender ASC Konzentration sank der HMA Anteil, während der HNA1 Anteil zunahm. Mit anderen Worten, je höher die ASC Konzentration im GK war, desto höher war der Anteil des oxidierten Albumins.

Hierzu muss erwähnt werden, dass die höheren GK Albuminkonzentration bei Störungen der Blut-Retina-Schranke, bzw. die niedrigen ASC Konzentrationen und evt. auch andere ASC konsumierende Prozesse (z.B.: ASC Oxidation durch ROS) auf das Ergebnis Einfluss genommen haben konnten.

Deshalb wurde eine spezifischere Auswertung von 58 PatientInnen der Kontrollgruppe durchgeführt. In dieser Gruppe waren, wie bereits erwähnt, keine Erkrankungen, welche mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht wurden – es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch Augenerkrankungen mit einer Störung der Blut-Retina-Schranke aus dieser Gruppe ausgeschlossen waren.

In diesem gut selektiertem Patientengut konnte wie zuvor ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen ASC und einer Abnahme von HMA bzw. Zunahme von HNA1 festgestellt werden. Für HNA2 konnte keine Korrelation ermittelt werden.

Wir erklären uns diesen Zusammenhang mit der Annahme, dass die prooxidativen Eigenschaften von ASC im GK die antioxidativen übersteigen. Dieser Zusammenhang steht im Einklang mit der neueren Literatur – es konnte nämlich experimentell gezeigt werden, dass die Höhe der ASC Konzentration den O_2 Abbau – und in weiterer Folge die H_2O_2 Bildung - signifikant beeinflusst. (22)

Offensichtlich ist die primäre Aufgabe von ASC, die O_2 -Konzentration im GK zu senken. Dabei fällt H_2O_2 an. Dieses muss weiter abgebaut werden, um der Entstehung von oxidativem Stress entgegenzuwirken. Grundsätzlich kommen für den H_2O_2 Abbau zwei enzymatische Wege in Frage: über die Katalase und über die Glutathionperoxidase.

Dabei führte jedoch nur die letztgenannte Reaktion zu einer Elimination von Sauerstoff – siehe Abbildung 27.

Oxidativer Stress im Glaskörper

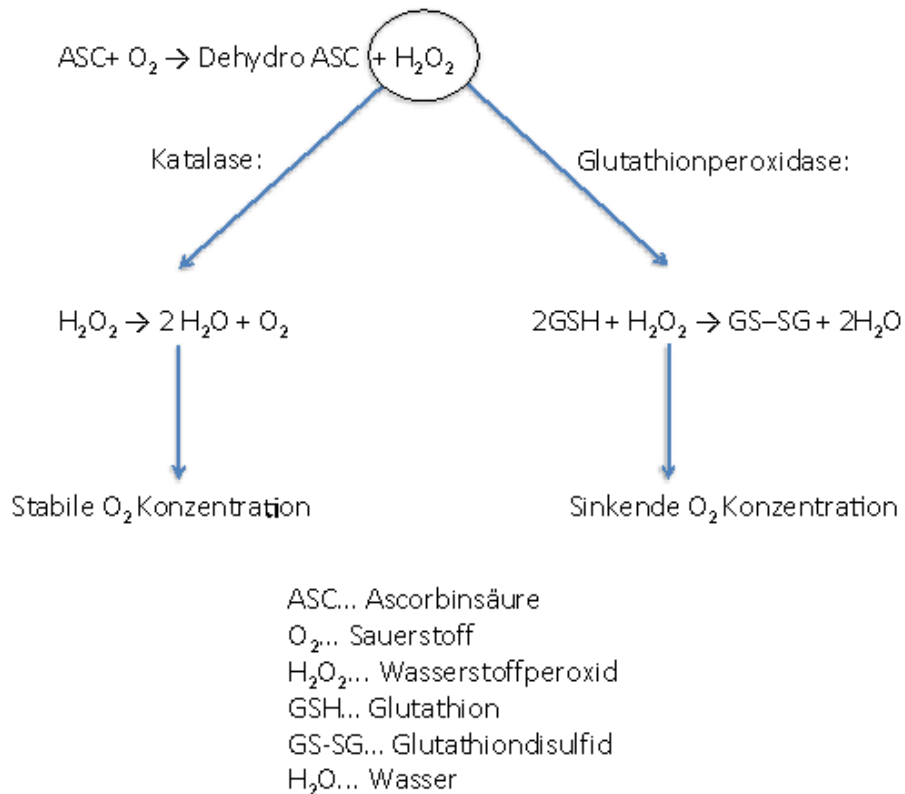


Abbildung 27: Vergleich der beiden enzymatischen H_2O_2 Abbauege durch die Katalase und die Glutathionperoxidase

Darüberhinaus passen unsere Ergebnisse sehr gut zu der Annahme, dass die Glutathionperoxidase für die Elimination von anfallendem H_2O_2 zuständig ist. Bei diesem Abbauege fällt Glutathiondisulfid (GSSG) an, welches in dynamischen Austausch mit anderen Thiol-Gruppen ist. Reagiert GSSG mit dem Cystein – 34 des Albumins, resultiert die Umwandlung HMA zu HNA1. So lässt sich auch gut erklären, weshalb mit ansteigender ASC Konzentration – über vermehrtem Anfall von GSSG resultierend aus dem H_2O_2 Abbau – auch der Anteil des HNA1 im GK stieg. Ein weiterer Faktor welcher zur GSSG Bildung bzw. in der Folge zu HNA1 führt, könnte die Redoxreaktion von GS/GSSG und ASC/Dehydro ASC darstellen. Bei der Sauerstoffelimination entsteht - wie in Abbildung 27 dargestellt – durch die Oxidation von ASC das Produkt Dehydro-ASC. Um einen suffizienten Sauerstoffabbau zu gewährleisten, ist jedoch ein stetig hoher ASC Spiegel notwendig. Durch die Reduktion von Dehydro-ASC im Rahmen der Glutathion-ASC Reduktion kann ASC wieder regeneriert werden. GS wird dabei zu GSSG oxidiert, welches wiederum zur HNA1

Oxidativer Stress im Glaskörper

Bildung beitragen könnte. Auch bei dieser Reaktion werden somit antioxidative Valenzen verbraucht. Eine graphische Darstellung der GS-SG Bildung bzw. der Bildung von HNA1 ist in Abbildung 28 zu finden.

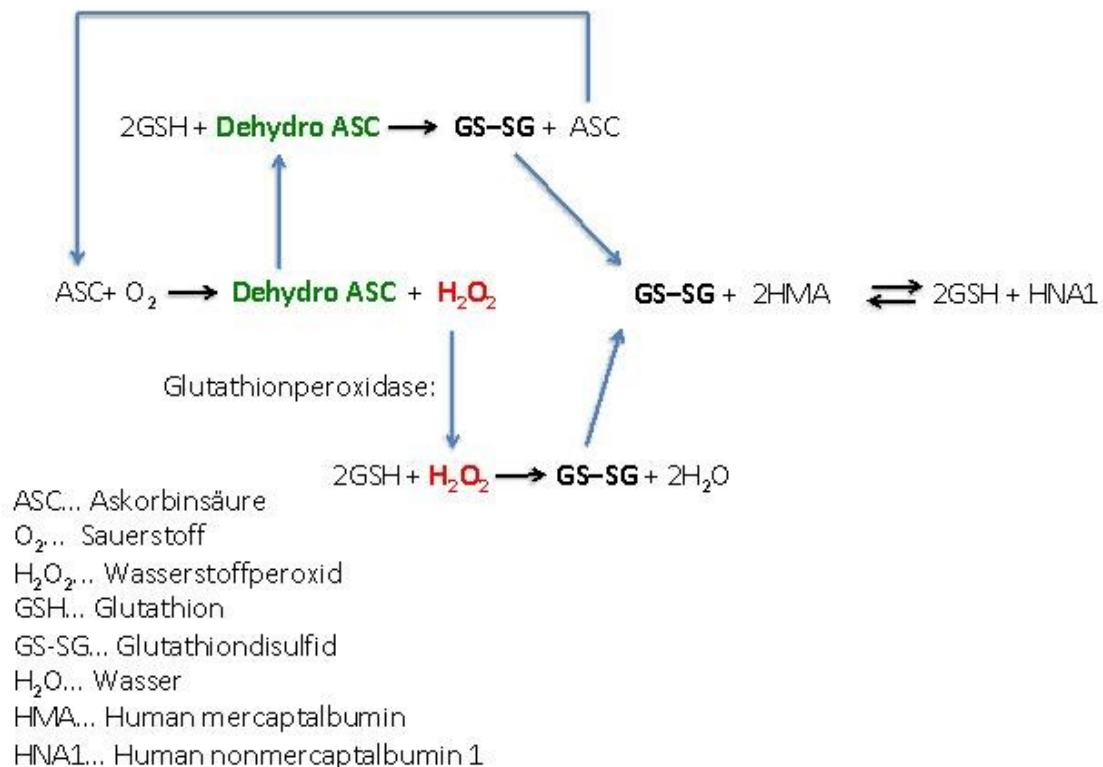


Abbildung 28: Model der GS-SG Entstehung bzw. Reaktion von HMA zu HNA1. Die Bildung von Glutathiondisulfid erscheint vor allem auf 2 Entstehungswege zurückzuführen zu sein: Zum einen aus dem enzymatischem Abbau von H₂O₂ und zum anderen über die nicht enzymatische Reduktion von Dehydro ASC. GS-SG steht in einem dynamischen Austausch mit anderen Thiolgruppen wie HMA unter Bildung von HNA1.

Obwohl eine höhere ASC Konzentration zu einem Verbrauch von antioxidativen Valenzen im GK Raum führt, ist der Schluss, dass ASC im GK ein Prooxidans ist zwar naheliegend aber dennoch nicht konklusiv. Beim O₂-Abbau entstehen zwar ROS – es muss jedoch auch bedacht werden, dass O₂ ebenfalls ein (mildes) Oxidans ist, welches möglicherweise über oxidative Prozesse zu einer Linsentrübung und einer Glaukomentwicklung führt.

Nichtsdestotrotz sollte die hochdosierte ASC Gabe bei der feuchten AMD nochmals genau überdacht werden – denn einerseits wird durch eine hohe GK ASC Konzentration der Sauerstoffpartialdruck im Auge gesenkt, was eine schlechtere Versorgung der Netzhaut nach sich ziehen könnte und andererseits könnten auch die vermehrt

Oxidativer Stress im Glaskörper

anfallenden ROS zu einer zusätzlichen Schädigung der Netzhaut führen. Inwieweit die orale Zufuhr von ASC auch den intraokularen ASC Spiegel bzw. ROS Bildung beeinflusst, wurde bis jetzt noch nicht untersucht – sollte aber speziell in Hinblick auf ASC-haltige Nahrungsergänzungsmittel Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte werden.

5.4 Experimente

Ziel dieser Experimente war die in vitro Untersuchung von Glaskörpern in Hinblick auf das Oxidationsverhalten. Um vergleichbare Bedingungen für die folgenden Experimente zu schaffen, wurden 7 eingefrorene Glaskörperproben aufgetaut, gepoolt, homogenisiert und anschließend aliquotiert (11 Aliquote zu je 250 µL) bzw. wieder eingefroren. Erwähnenswert ist, dass die für den Glaskörperpool verwendeten Glaskörper alle während der Vitrektomie als anliegend diagnostiziert wurden. Dies war deshalb wichtig, weil gerade bei anliegenden, nicht destruierten GK ein hoher Sauerstoffabbau beschrieben wurde. (22)

Für die jeweiligen Experimente wurden jeweils 1-2 Aliquote aufgetaut. Messgrößen waren jeweils die prozentuellen Oxidationszustände von Albumin, welche mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt wurden.

5.4.1.1.1 Bestandteile und Analyse des Glaskörperpools:

Insgesamt wurden 7 Glaskörperproben von 4 männlichen und 3 weiblichen PatientInnen verwendet. Alle Glaskörper wurden während der operativen Entnahme als „anliegend“ diagnostiziert. Der Grund für die Entnahme waren in 3 Fällen eine Epiretinale Membran, in 2 ein Makulaloch und jeweils in einem Fall eine submakuläre Blutung und ein vitreous traction Syndrom. Das mittlere Alter der PatientInnen beträgt $72,28 \pm 8,69$ Jahre (Spanne: 66-86 Jahre).

Der Glaskörperpool enthielt 1,05mg/mL Eiweiss, wovon 0,24mg/mL die Albuminfraktion ausmachten. 76,14% des Albumins lagen als reduzierte Form vor, 20,73 als HNA1 und 3,13% als HNA2.

5.4.2 Experiment 1: Oxidationsverhalten des GK Pools bei einer Inkubationstemperatur von 37°

5.4.2.1 Einleitung

Wie bereits beschrieben, wird im Glaskörper mittels ASC Sauerstoff abgebaut. Dabei entsteht als Zwischenprodukt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) welches wiederum zur Bildung von Hydroxylradikalen führen kann(siehe Abbildung 4). Diese wirken als starkes Oxidationsmittel und können Albumin dementsprechend verändern (=oxidieren).

Oxidativer Stress im Glaskörper

Ziel dieses Experimentes war, zu zeigen und zu untersuchen, dass bzw. wie sich der Oxidationsstatus von Albumin im Glaskörperaliquot über die Zeit hinweg – mit zunehmender Entstehung von freien Radikalen durch den Sauerstoffabbau - verändert.

5.4.2.2 Methode

Für dieses Experiment wurden 2 Aliquote aufgetaut und in einem Eppendorfhütchen neuerlich homogenisiert. In den Deckel des Hütchens wurde ein etwa 1mm² großes Loch gestanzt, um eine permanente Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgt bei 37°C; Es wurden zu Beginn und in weiterer Folge stündlich (bis Stunde 4) 50µL Glaskörper entnommen und der Oxidationsstatus des enthaltenen Albumins gemessen.

5.4.2.3 Ergebnisse

Die detaillierte Aufschlüsselungen der prozentuellen Albuminfraktionen sind in Tabelle 34 ausgeführt bzw. in Abbildung 29 graphisch dargestellt.

	0h	1h	2h	3h	4h
HMA %	76,14	55,91	25,45	16,71	10,80
HNA1 %	20,73	40,03	57,22	59,02	55,97
HNA2 %	3,13	4,07	17,32	24,28	33,23

Tabelle 34: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C

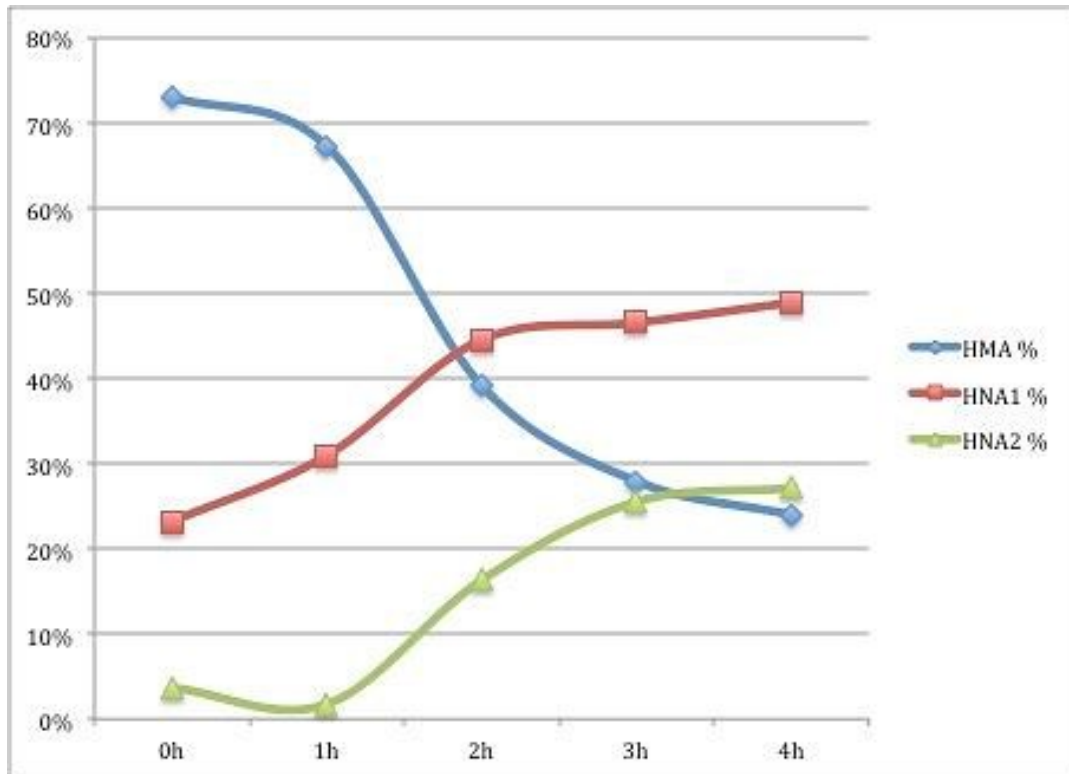


Abbildung 29: Graphische Darstellung des shiftes der verschiedenen Albuminfraktionen in Abhängigkeit der Inkubationszeiten

Die reduzierte Form von Albumin nahm über die gesamte Dauer des Experimentes hinweg ab, wobei der steilste Abfall in den ersten 2 Stunden passierte. Hingegen nahm die Fraktion des HNA1 bis zur Stunde 2 fast linear zu, flachte dann aber ab. Die Konzentration von HNA2, welche anfangs nur gering war, stieg nach der ersten Stunde an und flachte ab Stunde 3 ab.

5.4.2.4 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Der Sauerstoffabbau bzw. in weiterer Folge die Produktion von freien Radikalen erfolgte sowohl bei dem Experiment als auch in vivo bei 37°C.

Über nur 4 Stunden hinweg kam es zu einem beachtenswerten shift von reduziertem zu oxidiertem Albumin. Im Auge würde ein solcher shift gleichbedeutend mit einem hohen oxidativen Stress sein - mit dramatischen Folgen wie z.B.: Kataraktentstehung, Makuladegenerationen oder Glaukomentwicklung.

Es scheint daher, dass es Mechanismen im Auge gibt, welche das Auftreten von oxidativem Stress wie in unserem Experiment verhindern sollen.

Vergleicht man die Einflussfaktoren auf den GK zwischen unserem Experiment mit jenen im Auge erscheinen 2 Mechanismen naheliegend:

Oxidativer Stress im Glaskörper

- Zum einen die Limitierung der Sauerstoffzufuhr: Der Glaskörperpool war im Experiment einem stetigen Überangebot von Sauerstoff ausgesetzt. Der Glaskörper in vivo (im Auge) hat im Gegensatz dazu keinen direkten Luftkontakt. Die Sauerstoffzufuhr ist somit über den Blutfluss limitiert.
- Zum anderen ein stetig und reger Stoffwechsel: Die Stoffwechsel Ausgangsprodukte - insbesondere die Antioxidantien - waren in dem in vitro Experiment limitiert. Im Auge wird über den Ziliarkörper und den sogenannten „vitreous bulk flow“ ein stetiger Austausch der Stoffwechselprodukte sichergestellt. Vor allem die aktive Sekretion von Antioxidantien wie ASC oder Glutathion (in diesem Zusammenhang als Antioxidans) sollen der Entstehung von oxidativem Stress entgegenwirken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Prozess der Sauerstoffelimination mit einhergehender Radikalbildung im Glaskörper auch in vitro weiterläuft. Ohne die Limitation der Sauerstoffzufuhr und einem stetigen Austausch von Stoffwechselprodukten bzw. insbesondere der stetigen Sekretion ASC und Glutathion käme es in vivo sehr bald zu oxidativem Stress.

5.4.3 Experiment 2: Zusatz eines Chelatbildners

5.4.3.1 Einleitung

Dieses zweite Experiment sollte klären, in wie weit Metallionen bei der Bildung von freien Radikalen im Glaskörperraum beteiligt sind. ASC ist in der Lage Übergangsmetalle wie Kupfer oder Eisen zu reduzieren. Diese reduzierten Metallionen bilden mit Wasserstoffperoxid äußerst reaktive Radikale (Hydroxylradikale). Diese Reaktion wird Fenton Reaktion genannt. (98)

Wegen dieser Reaktion sind - unter physiologischen Bedingungen im Körper Übergangsmetalle proteingebunden, d.h. nicht reaktiv. Als Beispiel sei hier das Bindungsprotein Ferritin genannt welches auch im Glaskörper vorkommt. (14-16)

5.4.3.2 Methode

Es wurden 2 GK Proben aufgetaut und homogenisiert. Anschließend wurde dem Glaskörperhomogenat EDTA beigefügt (Konzentration, 10mmol/L entsprechend 2,92mg/mL). Ein Zusatz des Chelatbildners EDTA band alle Metallionen und verhinderte so eine Fenton Reaktion. Der Glaskörper wurde anschließend wie in Experiment 1 bei 37°C inkubiert und in weiter Folge das Albumin stündlich analysiert.

5.4.3.3 Ergebnisse

Die detaillierte Aufschlüsselung der prozentuellen Albuminfraktionen sind in Tabelle 35 ausgeführt bzw. in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

	0h	1h	2h	3h	4h
HMA %	75,12	52,14	28,00	17,00	10,02
HNA1 %	20,55	40,26	61,70	64,41	64,14
HNA2 %	4,33	7,60	10,30	18,58	25,84

Tabelle 35: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C nach Beimengung eines Chelatbilders

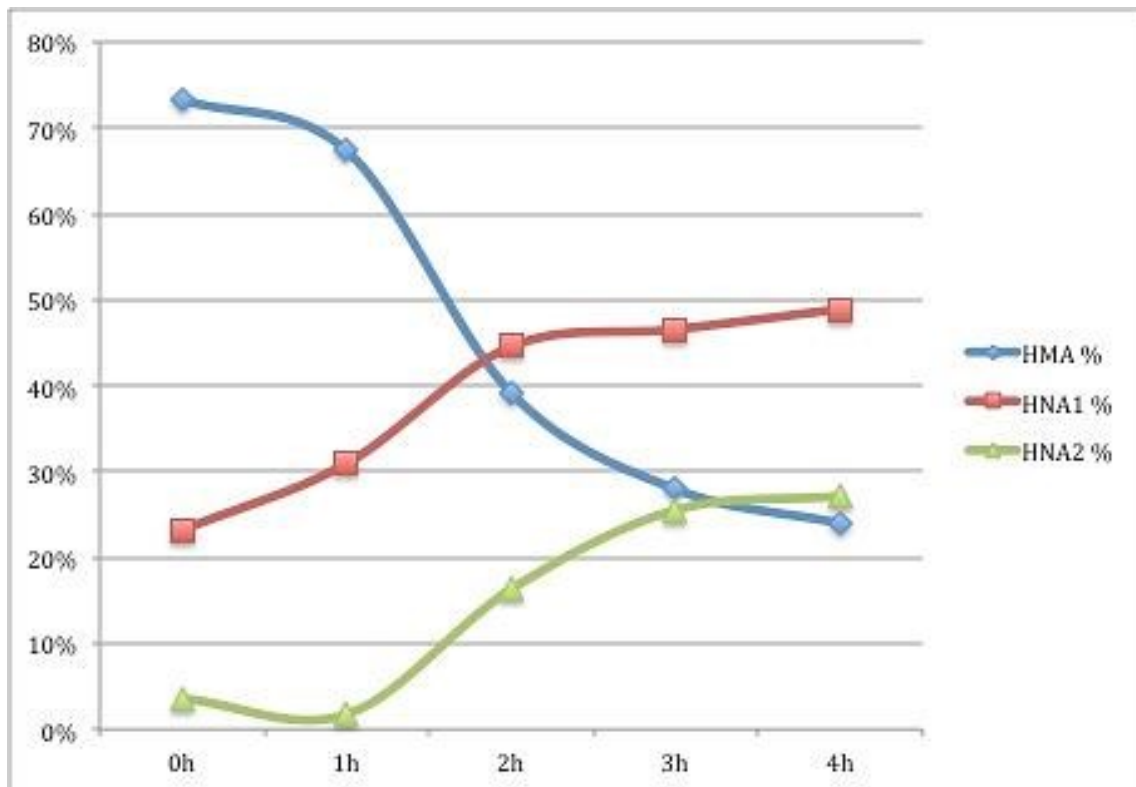


Abbildung 30: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C nach Beimengung eines Chelatbildners.

Auffällig dabei war, dass, verglichen mit Experiment 1, praktisch kein Unterschied im Albumin shift gefunden werden konnte.

5.4.3.4 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Durch die Beimengung von einem Chelatbindner wurden alle Ionen – insbesondere allfällig vorhandene Metallionen, gebunden. ASC kann zusammen mit Metallionen über die sogenannte Fentonreaktion Radikale bilden, welche Albumin oxidieren können(26). In Blutproben wird laut International Council Society of Haematology (ICSH) der Zusatz von 1,8mg/mL EDTA empfohlen, um durch Bindung der Calciumionen die Gerinnung zu verhindern. Viele Bestandteile des Glaskörpers wie ASC, Calcium und andere Elektrolyte bzw. auch das Wasser selbst entstammen einem Ultrafiltrat des Blutes (über den Zilliarkörper). Aus diesem Grund wurde der Entschluss gefasst, sich bei der EDTA Dosisfindung an dieser Empfehlung zu orientieren. Mit einer Dosierung von umgerechnet 2,92mg/mL überstiegen wir bewusst die empfohlene Menge von EDTA deutlich, um sicher alle Ionen zu binden.

In diesem Experiment konnte im Vergleich zu Experiment 1 kein Unterschied in den oxidierten/reduzierten Albuminfraktionen festgestellt werden. Es erscheint deshalb sehr unwahrscheinlich, dass für den Sauerstoffabbau bzw. die Radikalbildung im Glaskörper Metallionen eine Rolle spielen.

5.4.4 Experiment 3: GK Filtration

Ziel dieses Experimentes war, herauszufinden, ob die Radikalbildung im Glaskörper vom Vorhandensein von Proteinen beeinflusst wird. Hierzu wurden 750 µg Glaskörper filtriert. Wir erhielten dadurch 2 Fraktionen: zum einen den „Überstand“ – die GK Anteile, welche die Filtermembran nicht passieren konnten, und zum anderen das „Filtrat“ – jene Teile, welche die Filtermembran passieren konnten und in einem Auffangbehälter unterhalb der Membran gesammelt wurden. Für beide Fraktionen wurden gesonderte Analysen durchgeführt.

5.4.4.1 Methode der Filtration

Die Membran der „Zentrifugal Filter Einheit“ war für Moleküle bis zu einer Größe von 10.000 kDa permeabel. Die Zentrifugalkraft beträgt 14g, die Dauer für jeden Durchgang 45min wobei die Zentrifuge auf 0°C heruntergekühlt wurde. Bei dem Versuch wurden 750µg GK verwendet.

5.4.4.2 Überstand

Der Überstand wurde nach Filtration 2x gespült, um allfällige verbleibende niedermolekulare Substanzen sicher zu entfernen. Die Spülung erfolgte jeweils durch Zusatz von 500 µL PBS und erneutem Zentrifugieren. Anschließend wurde der Überstand mittels 500 µL PBS Puffer (=Phosphate Buffered Saline) wieder in Lösung gebracht. Im Anschluss wurde der Überstand über 4h inkubiert bzw. währenddessen stündlich der Redoxzustand des Albumins gemessen.

5.4.4.3 Ergebnisse

Verglichen mit Experiment 1 veränderte sich der Anteil des HMAs im Überstand geringfügig langsamer. Die detaillierten Ergebnisse sind unter Tabelle 36 zu entnehmen, eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 31.

	0h	1h	2h	3h	4h
HMA %	74,10	72,11	67,42	65,39	64,26
HNA1 %	24,75	24,18	24,29	26,50	24,77
HNA2 %	1,15	3,71	8,29	8,11	10,98

Tabelle 36: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Überstandes

Oxidativer Stress im Glaskörper

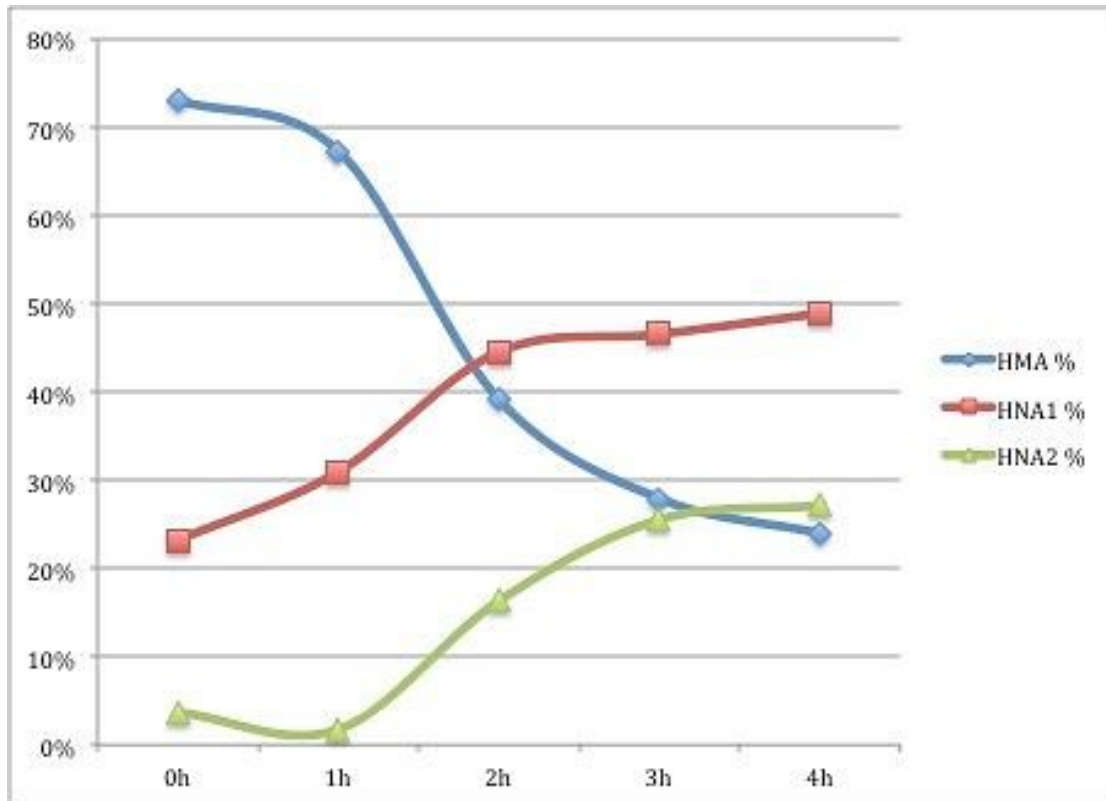


Abbildung 31: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen im Überstand in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei 37°C

5.4.4.4 Filtrat

Da Albumin mit 65.000 kDa im Überstand zurückblieb, wurde dem Filtrat erneut Albumin hinzugefügt (auf eine Konzentration von 0,24mg/mL). Dieser Ansatz wurde bei 37° inkubiert und stündlich hinsichtlich der Albuminoxidation analysiert.

5.4.5 Ergebnisse

Es zeigte sich – verglichen mit Experiment 1 – eine raschere Albuminoxidation und vor allem ein früher Anstieg von HNA2. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 37 zu entnehmen, eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich Abbildung 32.

Oxidativer Stress im Glaskörper

	0h	1h	2h	3h	4h
HMA %	69,27	34,97	23,62	14,58	11,86
HNA1 %	28,24	50,28	53,36	53,28	52,70
HNA2 %	2,49	14,75	23,03	32,14	35,44

Tabelle 37: Prozentuelle Verteilung der Albuminfraktionen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Filtrates.

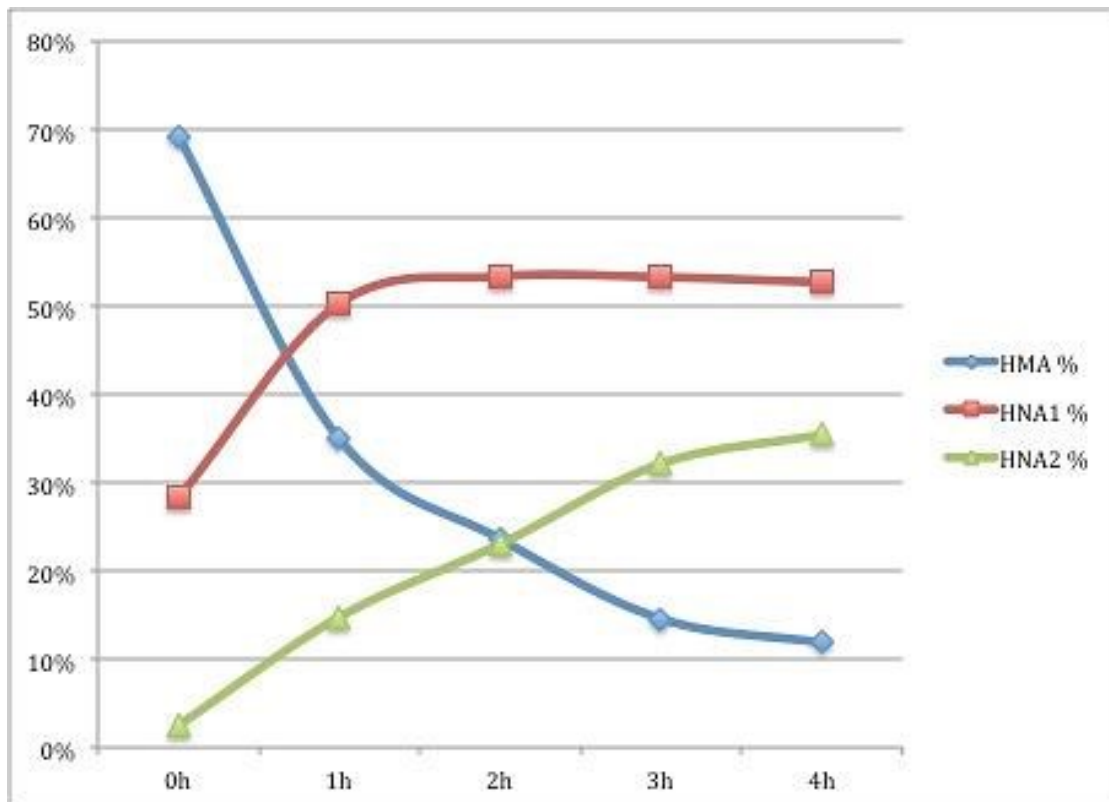


Abbildung 32: Graphische Darstellung des shifts der verschiedenen Albuminfraktionen im Filtrat in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

5.4.5.1 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Durch die Filtration des Glaskörpers durch eine Membran, welche für Moleküle nur bis zu einer Größe von 10.000 kDa permeabel ist, erhielten wir einen Überstand und ein Filtrat. Das Albumin des Überstandes wurde über die Zeit hinweg kaum oxidiert. Hingegen passierten- verglichen mit Experiment 1 - im Filtrat sehr viel rascher Oxidationsprozesse.

Wir führen dies darauf zurück, dass die Membran für (die kleineren) oxidativ wirkenden Bestandteile (v.a. Asc) permeabel ist, während größere, antioxidativ wirkende

Bestandteile (z.B.: Katalase oder Gluthationperoxidase) im Überstand zurückgeblieben sind.

5.4.6 Experiment 4: Kontrollexperiment

5.4.6.1 Einleitung

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass Albumin über spontane, vom Glaskörper-Milieu unabhängige Faktoren oxidiert wird.

5.4.6.2 Methode

Plasmaalbumin welches aus Plasma von gesunden Spendern (über eine Affinitätsäule Cibachrom blue) präpariert wurde, wurde entsprechend der Konzentration im GK verdünnt (0,24 mg/mL) und bei 37° 4h lang inkubiert. Im Anschluss wurden die verschiedenen oxidierten Albuminfraktionen bestimmt.

5.4.6.3 Ergebnisse

Der Oxidationszustand des Albumins änderte sich in dieser Zeit fast nicht. Die relativen Werte der Albuminfraktionen sind in Tabelle 38 abgebildet, die graphische Darstellung dieser Werte ist in Abbildung 33 zu finden.

	0h	4h
HMA %	73,06	70,58
HNA1 %	23,21	27,55
HNA2 %	3,73	1,87

Tabelle 38: Albumin 4 Stunden lang inkubiert: relative Werte der verschiedenen Albuminfraktionen

Oxidativer Stress im Glaskörper

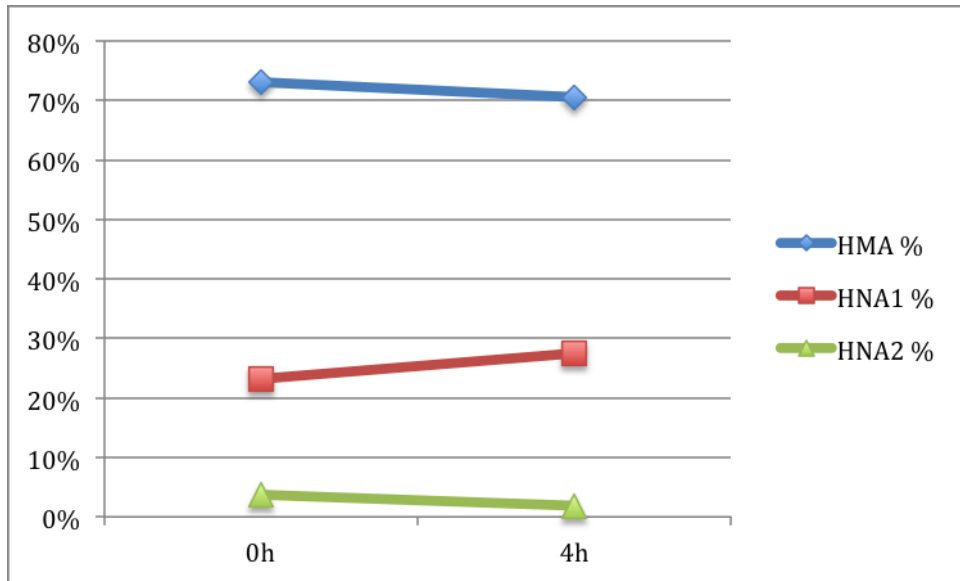


Abbildung 33: Albumin 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert: graphische Darstellung der zeitlichen Änderung der relativen Albuminfraktionen

5.4.6.4 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Die Veränderung des Oxidationszustand des Glaskörper Albumins war somit in erster Linie auf Prozesse im Glaskörper zurückzuführen.

5.5 Klinische Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf den Glaskörper am Beispiel Glaukom

5.5.1 Einleitung

Freie Radikale sind grundlegend am Prozess des Alterns beteiligt. Wirken die freien Radikale auf den GK – insbesondere auf die enthaltene Hyaluronsäure – kommt es zu einer Depolymerisation der Hyaluronsäure. In der Folge verliert diese ihren viskösen Charakter und der Glaskörper verflüssigt sich. Klinisch wirkt sich die Destruktion bzw. Verflüssigung des Glaskörpers in der sogenannten Hinteren Glaskörperabhebung aus. Dabei löst sich die GK – Grenzmembran von der inneren limitierenden Membran der Netzhaut. Am häufigsten tritt dieses physiologische Ereignis – bei gesunden Probanden - zwischen dem 70. und dem 80. Lebensjahr auf. (7,25,26,72)

Oxidativer Stress wurde mit dem Auftreten vieler Augenerkrankungen in Zusammenhang gebracht - besonders interessant erscheint hierbei das Glaukom, da sich diese Erkrankung in nächster Nähe zum GK manifestiert. (32,71) In unserer Studie konnte bereits im Rahmen der Analyse des Albuminredoxstatus gezeigt werden, dass signifikant mehr Albumin im GK von GlaukompatientInnen oxidiert war.

Das Glaukom (syn. Grüner Star) ist weltweit die häufigste Ursache einer irreversiblen Erblindung. Es kommt bei dieser Erkrankung zu einer Apoptose der retinalen Ganglienzellen. Dies führt zu fortschreitenden, größer werdenden Gesichtsfelddefekten, welche unbehandelt in einer irreversiblen Blindheit enden. (99) Zahlreiche Studien legen den Schluss nahe, dass beim Glaukom oxidativer Stress mit der Apoptose der retinalen Ganglienzellen vergesellschaftet ist. (7,25,26,72) Der Glaskörper ist anatomisch von der Ganglienzellschicht nur durch die hauchdünne (70-400nm) innere limitierende Membran getrennt. Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob sich die ROS, welche im Rahmen der Ganglienzellapoptose entstehen, auch auf den GK im Sinne einer früheren (prematuren) GK Abhebung auswirken. (100) Um unsere Ergebnisse (Albumin war bei GlaukompatientInnen anteilmäßig signifikant mehr oxidiert) weiter nachzugehen, haben wir GlaukompatientInnen mit einer Kontrollgruppe hinsichtlich des Vorkommens einer GK Abhebung untersucht.

5.5.2 Methode

Ausgeführt wurde diese Studie an der Univ. Augenklinik Graz. Unser Vorhaben wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt bzw. nach der Deklaration von Helsinki ausgeführt.

Die Teilnehmer der Glaukomgruppe wurden im Zeitraum zwischen Dezember 2013 und Juni 2015 rekrutiert. Als Vergleich diente eine Patientengruppe welche im Rahmen einer anderen Studie (Prevalence of early and late stages of physiologic PVD in emmetropic elderly population(25)) hinsichtlich GK Abhebungen untersucht wurde. Die Einschlusskriterien für beide Gruppen waren:

- Alter über 18 Jahre
- Keine intrakulare(n) Operation(en) oder Lasereingriff(e)
- Eine Achsenlänge ermittelt durch eine optische Biometrie (IOL Master; Zeiss, Jena Deutschland) zwischen 21,5 und 24,5mm
- Keine Erkrankungen des vitreoretinalen Interfaces wie beispielsweise Gefäßverschlüsse, altersbedingte Makuladegeneration, Epiretinale Membran etc...
- Keine erhebbare Episode einer intraokularen Entzündung
- Kein erhebbares okuläres Trauma
- Kein Diabetes mellitus

Bei jedem GlaukompatientenIn wurden die glaukomspezifischen Routine Untersuchungen durchgeführt. Diese beinhalten:

- Visus
- Goldmann Applanationstonometrie
- Gonioskopie
- Pachymetrie
- Papillendiagnostik mittels Heidelbergtomographen III® (HRT)
- Papillendiagnostik mittels optischen Kohärenztomographie (OCT, Heidelberg Spectralis®),)
- Papillendiagnostik mittels Funduskopie
- Gesichtsfelduntersuchung (Interzeag Octopus 101, programme G2 oder Goldmann Perimetrie bei einem Visus von unter 0,1)

Darüber hinaus wurde bei jedem PatientIn ein Papillenfotografie angefertigt. Die Diagnose „Glaukom“ wurde anhand des Papillenfotografiebefundes und dem Vorhandensein

Oxidativer Stress im Glaskörper

glaukomtypischer Gesichtsfelddefekte gestellt. Des Weiteren wurde die Klassifikation des Glaukoms erhoben (Primäres Offenwinkelglaukom, Pigmentglaukom, Pseudoexfoliationsglaukom).

In die Kontrollgruppe wurden nur PatientInnen ohne funktionellen oder morphologischen glaukomtypischen Defekt eingeschlossen. Des Weiteren wurden nur PatientInnen mit einem Augendruck unter 21mmHg – ohne antiglaukomatöse Therapie – eingeschlossen.

Durchführung

Zunächst wurden OCT scans der Makula in medizinischer Mydriase durchgeführt. Mittels OCT konnten foveale Adhäsionen des GK sowie zentral abgehobene GK sehr gut diagnostiziert werden.

Konnte mittels OCT der GK nicht visualisiert werden, wurde eine B-scan Ultraschalluntersuchung mittels 20MHz bei 90 dB (Avisio 3.0; Quantel Medical, France) durchgeführt, um den GK als komplett anliegend oder komplett abgehoben klassifizieren zu können.(22) (Entscheidungsbaum siehe Abbildung 34)

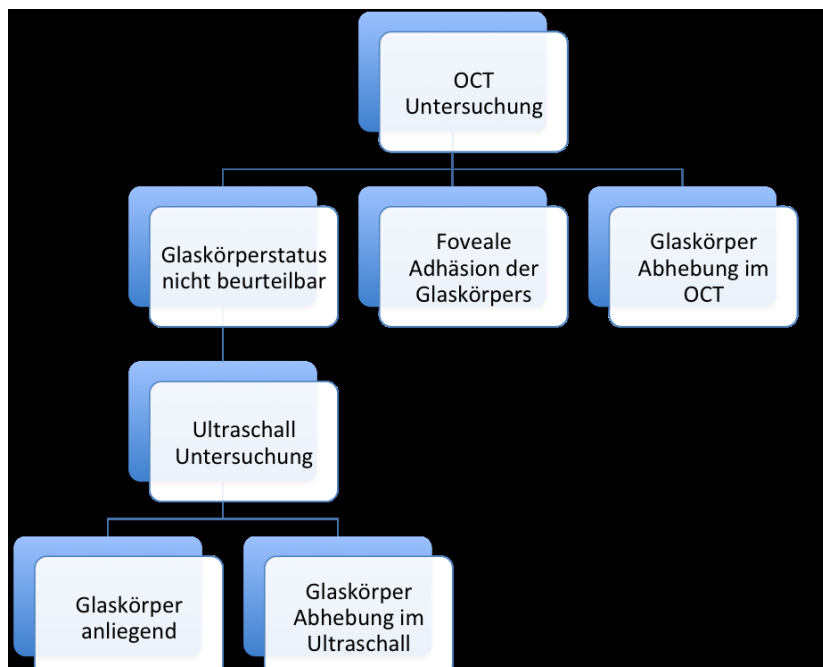


Abbildung 34: Untersuchungs- Entscheidungsbaum (OCT: optische Kohärenz Tomographie, US: Ultraschall)

Oxidativer Stress im Glaskörper

Entsprechend der Klassifikation, welche Unchino et al. (101) in der Arbeit "Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography" vorschlägt, wurde das Anfangsstadium einer GK Abhebung ("*initial stage*") als eine Separation der GK Grenzmembran von der inneren limitierenden Membran der Netzhaut in mindestens einem Makulaquadranten – bei jedoch erhaltener vitreoretinaler Adhäsion – bezeichnet (Abbildung 35b.).

Fortgeschrittene GK Abhebungen ("*Advanced stages*") wurden durch eine vollständige Abhebung des GK in der Makula bzw. variable vitreoretinale Adhäsion in der Mittleren Peripherie bis hin zur GK Basis definiert (Abbildung 35c+d).

Ein anliegenden Glaskörper ("*No PVD*") wurde dadurch definiert, dass die GK Grenzmembran weder im OCT noch im Ultraschall (US) zu sehen war (Abbildung 35a).

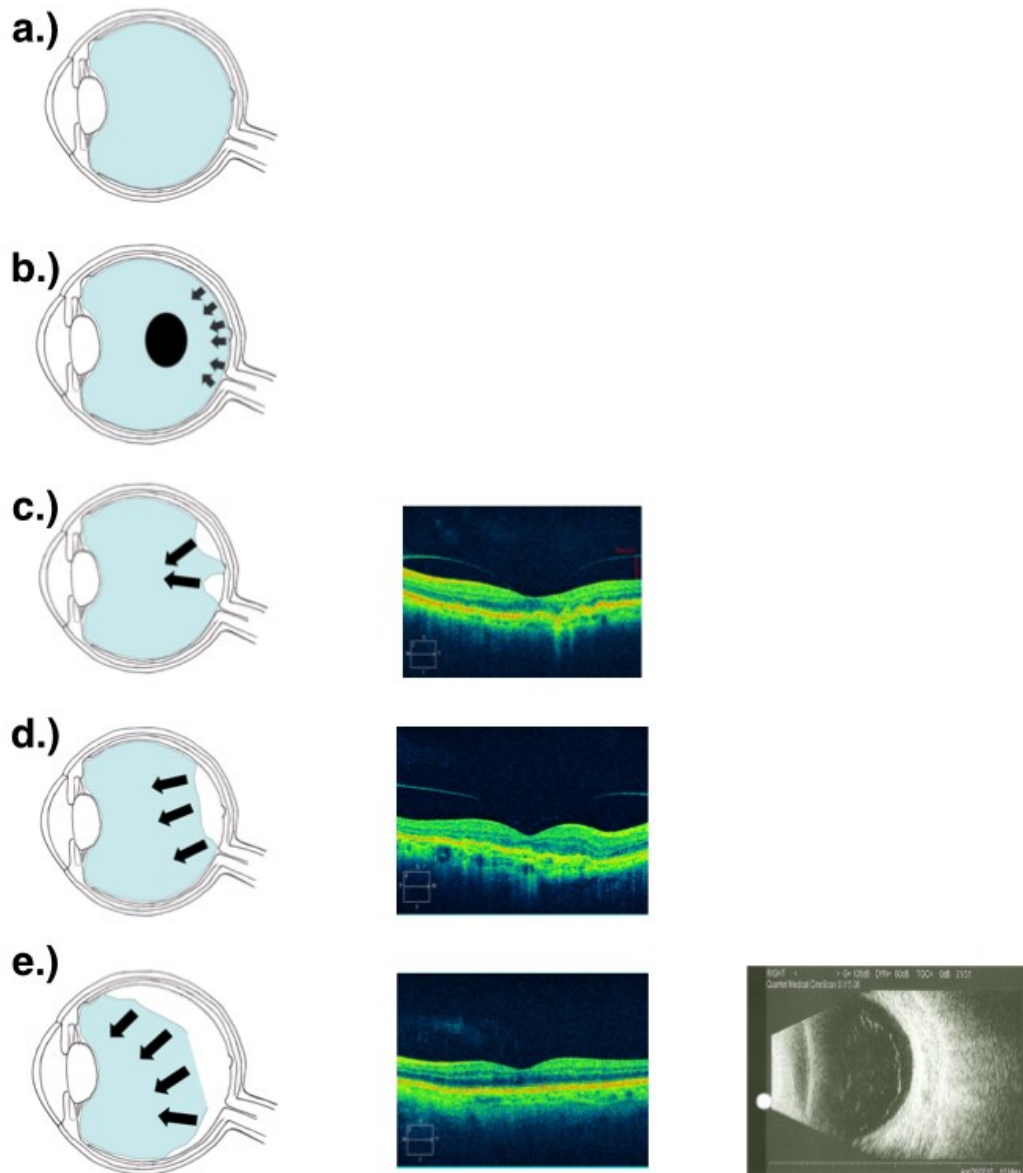


Abbildung 35: GK Befunde:

a.) Anliegender Glaskörper: Die Glaskörper Grenzmembran kann weder im Ultraschall noch im OCT dargestellt werden.

b.) Durch eine Verflüssigung des Glaskörpers wird eine Glaskörperabhebung induziert

c.) Foveale Adhäsion: Der hintere Glaskörper ist teilweise abgehoben, es besteht jedoch noch eine Adhäsion der Glaskörper Grenzmembran mit der Fovea – dies kann gut im OCT dargestellt werden.

d.) Abgehoben im OCT: Die hintere GK Grenzmembran - visualisiert durch das OCT – hat keinen Kontakt mehr zur zentralen Netzhaut.

e.) Abgehoben im Ultraschall: In diesem Spätstadium der GK Abhebung hat die GK Grenzmembran keinen Kontakt zur ILM. Die Glaskörper Abhebung ist so weit fortgeschritten dass die GK Grenzmembran nicht mehr im OCT dargestellt werden kann.

5.5.2.1 Datenmanagement und Analyse

Gespeichert wurde die Daten in Excel:mac2011 (Version 14.6.19 Microsoft Excel für Mac 2011; Microsoft cooperation), ausgewertet wurden die Daten in SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

In der Glaukomgruppe konnten bei 35 von 48 PatientInnen (73%) beide Augen eingeschlossen werden, bei der Kontrollgruppe konnten bei 92 von 238 PatientInnen beide Augen eingeschlossen werden.

Um die Ergebnisse nicht durch die unterschiedliche Anzahl von beidseits/einseits dokumentierten Augen zwischen den Gruppen zu beeinflussen, wurde für die Analyse jeweils nur ein Auge pro PatientIn herangezogen: Dies war – sofern nicht nur das linke Auge dokumentiert war – das rechte Auge des PatientenIn.

Die selbe statistische Analyse, ausgeführt für das linke Auge eines jeden PatientenIn – sofern nicht nur das rechte Auge dokumentiert war –, hat zu dem selben Ergebnis geführt.

Es wurde eine ordinale logistische Regressionsanalyse durchgeführt, wobei das Stadium der GK Abhebung als “response variable” und das Vorhandensein eines Glaukoms als “group variable” herangezogen wurde. Des weiteren wurde das Modell alters-, geschlechts- und achsenlängenbereinigt ausgeführt. Die Ergebnisse werden als “odds ratios” (ORs) mit einem 95% Konfidenzintervall (confidence interval CI) angegeben. Kategoriale Variablen werden als Anzahl und Prozentsatz dargestellt, kontinuierliche Werte als Mittelwert±Standardabweichung (MW±SD). Kategoriale Unterschiede wurden mittels Fisher’s exact Test untersucht, kontinuierliche mit dem Mann-Whitney U Test.

5.5.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 286 Augen von 286 PatientInnen (48 Glaukom PatientInnen und 238 KontrollpatientInnen) inkludiert. Die demographischen Daten sind Tabelle 39 zu entnehmen.

	Kontrollen n=238	Glaukom n=48	p-Wert
Geschlecht: weiblich/männlich (%)	151/87 (63.40/36.60)	24/24 (50.00/50.00)	0.104
Alter MW±SA (von-bis)	74.9±8.80 (44-89)	66.5±11.90 (31-89)	<0.001
Achsenlänge (mm) MW±SA (von-bis)	23.01±0.70 (21.50- 24.50)	23.41±0.70 (21.88-24.50)	<0.001

Tabelle 39: Demographische Daten der eingeschlossenen PatientInnen

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden für das Alter und die Achsenlänge gefunden.

In der Glaukomgruppe wurde das primäre Offenwinkelglaukom in 38 Augen (79.2%), diagnostiziert, ein Pseudoexfoliationsglaukom in 9 Augen (18.8%) und ein Pigmentdispersionsglaukom in einem Auge (2.1%).

Die erhobenen glaukomspezifischen Indikatoren der Glaukompatienten sind in Tabelle 40 zu finden.

OCT-Glaucoma-Global-Indices, MW±SA (von-bis)	65.21 ±14.14 (34-91)
HRT- Rim-Area in mm ² , MW±SA (von-bis)	1.08 ±0.36 (0.24-1.93)
HRT- Rim-Vol in mm ³ , MW±SA (von-bis)	0.23 ±0.12(0.02-0.5)
Mean deviation (dB), MW±SA (von-bis)	10.08±6.0 (2.1-24.1)

Tabelle 40: Glaukomspezifische Indikatoren der GlaukompatientInnen; OCT-Glaucoma-Global-Indices = mittlere peripapilläre Nervenfaserschichtdicke ermittelt durch die optische Kohärenztomographie; HRT-Rim-Area/Vol= Fläche und Volumen des Papillenrandsaumes ermittelt durch den Heidelberg Tomograph; Mean deviation = mittlere Sensitivitätsabweichung der Gesichtsfelduntersuchung.(MW±SD = Mittelwert±Standardabweichung)

Keine GK Abhebung bzw. ein anliegender GK wurde in 3 (6.3%) der Glaukomaugen und in 54 (22.7%) der Kontrollaugen gefunden. Eine initiale GK Abhebung (initial stage) wurde in 7 (14.6%) der Glaukomaugen und in 42 (17.6%) der Kontrollaugen gefunden.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Sogenannte „Advanced stage“ Abhebungen wurden in 38 (79.2%) Glaukomaugen und in 142 (59.7%) Kontrollaugen gefunden.

Eine graphische Darstellung der relativen erhobenen Häufigkeiten der verschiedenen GK Stadien ist unter Abbildung 36 zu finden.

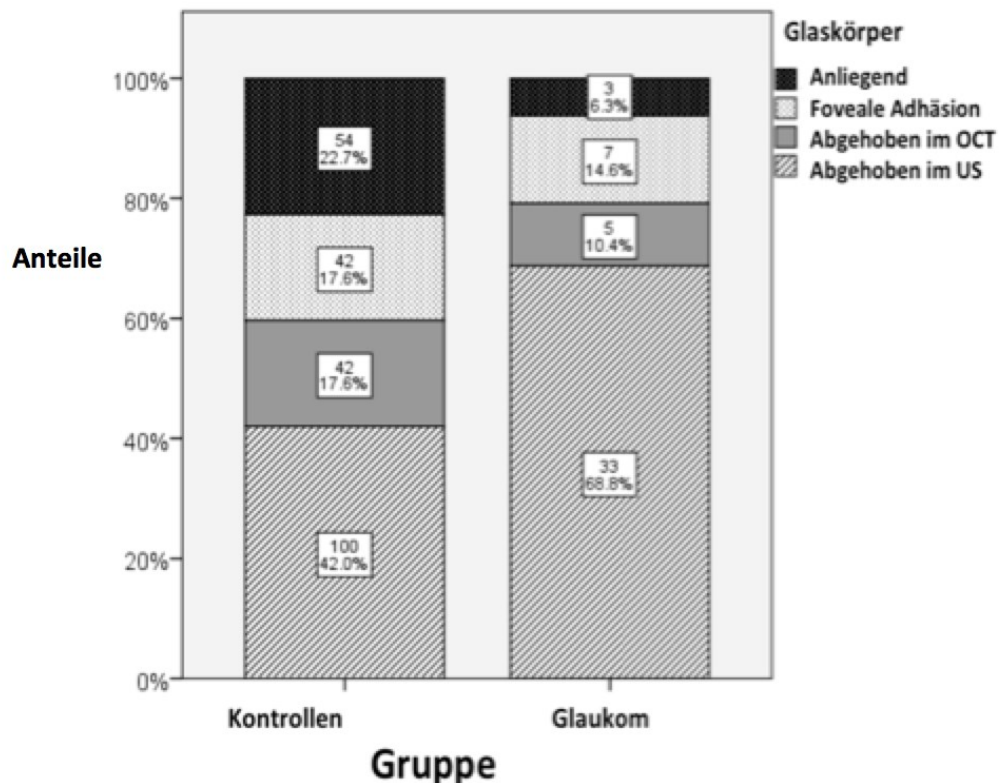


Abbildung 36: Relative Häufigkeiten der verschiedenen GK Stadien

Durch eine ordinale logistische Regressionsanalyse, welche das Alter, das Geschlecht und die Achsenlänge berücksichtigte, konnte gezeigt werden, dass GlaukomaPatientInnen im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant häufiger fortgeschrittene GK Abhebungen (advanced stages) (OR=4.24, 95% CI: 1.83 – 9.81; $p < 0.001$) aufwiesen. Weitere signifikante Assoziationen mit fortgeschrittenen GK Abhebungsstadien wurden für das Alter (OR=1.05, 95% CI: 1.02 – 1.08; $p < 0.001$) und das Geschlecht (weiblich) (1.69, 95%CI: 1.01-2.82, $p = 0.045$) entdeckt, nicht aber für die Axenlänge (OR 1.32, 95% CI: 0.95-1.85, $p = 0.098$).

Das Alter der PatientInnen mit fortgeschrittenen GK Abhebungen (advanced stages) betrug in der Glaukomgruppe 66 ± 12.70 Jahre (von 31 bis 89) und 77.00 ± 8 Jahre (von 45 bis 89) in der Kontrollgruppe ($p < 0.001$), das Alter bei initialer GK Abhebung

64.10±11.70 Jahre (von 46 bis 82) in der Glaukomgruppe und 72.40±9.30 Jahre (von 46 bis 87) in der Kontrollgruppe. Das Alter bei anliegendem GK war 69.30±2.10 Jahre (von 67 bis 71) in der Glaukomgruppe und 71.40±10.00 Jahre (von 44 bis 87) in der Kontrollgruppe.

5.5.4 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Das Glaukom ist charakterisiert durch einen progressiven Verlust von retinalen Ganglienzellen und deren Axone durch Apoptose. Mit dem Untergang dieser Zellen wurde das Auftreten von oxidativem Stress beschrieben(61,62,76)Wie bereits in der Einleitung erwähnt, bezeichnet oxidativer Stress eine Situation, in welcher das Auftreten ROS das physiologische Ausmaß überschreitet – sprich, ein biologisches System ist nicht mehr in der Lage, die ROS (beispielsweise durch Antioxidantien) unschädlich zu machen. Als Folge können Proteine, Lipide, die DNA oder aber Glykosaminoglykane geschädigt werden. Ein solches möglicherweise betroffenes Glykosaminoglykan ist die Hyaluronsäure des Glaskörpers. In unserer Studie haben wir die Hypothese untersucht, ob oxidativer Stress, welcher beim Glaukom in der inneren Netzhautschicht entsteht, den GK ebenfalls – im Sinne einer prematuren hinteren Glaskörperabhebung - beeinflusst.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass GlaukompatientInnen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein 4fach erhöhtes Risiko haben, eine fortgeschrittenen GK Abhebung aufzuweisen. Darüber hinaus zeigte sich, dass die PatientInnen, welche eine fortgeschrittene GK Abhebung aufwiesen, in der Glaukomgruppe signifikant jünger waren als jene aus der Kontrollgruppe. An dieser Stelle soll angemerkt werden, dass das fortgeschrittene Alter der stärkste Risikofaktor für das Auftreten einer GK Abhebung ist(8,24,25,102)In diesem Zusammenhang erscheint es weiters interessant, dass anliegende GK viel seltener in der Glaukomgruppe diagnostiziert wurden – und dass obwohl die Gruppe der GlaukompatientInnen signifikant jünger war als die Kontrollgruppe.

Wir postulieren, dass die Ursache dieser Beobachtung das vermehrte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies ist, welche eine GK Verflüssigung bzw. in weiterer Folge GK Abhebung verursachen. Hydroxyl Radikale sind beispielsweise in der Lage, Hyaluronsäure zu depolymerisieren, wodurch diese ihren Gelcharakter oxidativ bedingt verliert. (7,26)

Der Alterungsprozess ganz allgemein ist – neben anderen Faktoren - auf Akkumulation von Radikal bedingten Schädigungen zurückzuführen. Im Auge führt dieser Prozess beispielsweise zu einer Verflüssigung des GK Gels bzw. in weiterer Folge zu einer GK Abhebung.(6,8,30,69) Es scheint naheliegend, dass das Auftreten von freien Radikalen bzw. oxidativem Stress in den inneren Netzhautschichten – wie beispielsweise in der Ganglienzellschicht beim Glaukom – auch auf den GK wirkt.(6,30,69)

Aus einem klinischen Blickwinkel scheint das sehr interessant, könnte so nämlich das Auftreten einer prematuren GK Abhebung als Hinweis für das Vorhandensein eines Glaukoms stehen. Zu diesem Thema wurden bereits Studien durchgeführt – jedoch konnte eine solche Assoziation bis dato nicht gezeigt werden. (103,104)Wir schreiben diese Diskrepanz zu unseren Ergebnissen den verschiedenen Studiendesigns zu: Zum einen wurde in den erwähnten Studien der GK Status nur klinisch detektiert, trotzdem gezeigt werden konnte, dass eine Kombination aus US und OCT Untersuchung eine viel präzisere GK Status Analyse erlaubt. (25,103)

Des weiteren wurden bei zuvor durchgeführten Studien Komorbiditäten – speziell solche des vitreoretinalen Interfaces (wie die diabetische Retinopathie oder Thrombosen beispielsweise) nicht ausgeschlossen. (23,102)Ebenso wurde bei diesen Studien die Achslänge nicht berücksichtigt trotzdem diese nach dem Alter den zweit wichtigsten Risikofaktor für eine frühe HGA darstellt.

Bei unserer Studie haben wir nicht nur diese Faktoren berücksichtigt, sondern darüber hinaus auch nur phake Augen eingeschlossen, da eine stattgehabte Kataraktoperation ebenfalls eine HGA induzieren kann. (10,11,85,105)Da wir für unsere Untersuchungen eine Kombination aus US und OCT verwendet haben bzw. da wir auch sehr strenge Ein- und Ausschlusskriterien angewandt haben, liefert unsere Studie validere Ergebnisse als die bereits zitierten.

Limitierend bei unseren Ergebnissen ist jedoch, dass die beiden Gruppen unabhängig voneinander rekrutiert und untersucht wurden. Daher differiert das Alter zwischen diesen Gruppen. Da die Glaukomgruppe jedoch im Schnitt jünger als die Kontrollgruppe ist, würde man eine niedrigere Prävalenz der HGA annehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall, weshalb man annehmen darf, dass der gemessene Effekt ein realer ist.

Weitere Studien erscheinen jedoch als notwendig, um die premature HGA als möglichen Risikofaktor für das Vorliegen eines Glaukoms zu identifizieren.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen das Teile dieses Abschnittes bereits vor Fertigstellung der Dissertation publiziert wurden.(1)

6 Ausgewählte Zusammenhänge

Die vorliegende Arbeit ist – der Ausführung nach - in 3 Teile gegliedert:

- Im ersten Teil wurde der Redoxstatus von Albumin im GK unter der Berücksichtigung verschiedenster Faktoren ermittelt;
- Im zweiten Teil wurden GK unter experimentaler Setting hinsichtlich dem Oxidationsverhalten untersucht;
- Der dritte Teil befasst sich mit den klinischen Auswirkungen vom vermehrten Auftreten freier Radikale beim Glaukom.

Die einzelnen Ergebnisse wurden – jeweils für sich - bereits ausführlich diskutiert. In diesem Abschnitt sollen nun speziell ausgewählte Zusammenhänge der gewonnenen Ergebnisse beleuchtet werden.

O₂ und H₂O₂ Abbau

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Albumin in einem 37° inkubierten GK pool zunehmend oxidiert wurde. Dieser Prozess lief deutlich schneller ab nachdem hochmolekulare Stoffe – zu jenen auch Enzyme zählen, nicht jedoch ASC - aus dem GK durch Filtration entfernt wurden – siehe Abbildung 32.

Dies legte einerseits den Schluss nahe, dass die O₂ Degradation nicht durch ein Enzym katalysiert wird und des weiteren, dass das dabei anfallende H₂O₂ enzymatisch abgebaut wird.

Bei der statistischen Analyse von HMA und HNA1 aus GK Proben fiel eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen HMA und ASC bzw. eine ebenfalls hochsignifikante, jedoch positive Korrelation zwischen HNA1 und ASC auf. Dies schien die Beobachtung, dass ASC eine zentrale Rolle beim O₂ -Abbau einnimmt, ebenfalls zu bestätigen. (22,90,106)

Beim Abbau von O₂ fällt H₂O₂ – ein starkes Oxidationsmittel – an(4,5,22)Die Tatsache dass H₂O₂ Zellen und Zellbestandteile schädigen kann bzw. die oben genannten experimentellen Ergebnisse aus unserer Studie deuten stark darauf hin, dass H₂O₂ enzymatisch abgebaut wird.

Oxidativer Stress im Glaskörper

Für diesen Abbau kommen grundsätzlich zwei enzymatische Reaktionswege in Frage:

- Katalase: $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- Glutathionperoxidase: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Dabei führte jedoch nur die letztgenannte Reaktion zu einer Elimination von Sauerstoff – siehe Abbildung 27 – und erscheint daher viel wahrscheinlicher.

Beim glutathionperoxidasekatalysierten H_2O_2 Abbau fällt Glutathiondisulfid (GSSG) an, welches in dynamischem Austausch mit anderen Thiol- Gruppen ist. Reagiert GSSG mit dem Cystein – 34 des Albumins, resultiert die Umwandlung von HMA zu HNA1 – siehe Abbildung 28. Auch die Analyse des Redoxstatus des GK Albumins scheint diesen Verdacht zu erhärten: Im Vergleich zum Plasma wies der GK nämlich signifikant niedrigere HMA Werte bzw. höhere HNA1 Werte auf.

Oxidativer Stress und Glaukom

Bei der Analyse von Albumin aus GK Proben konnte gezeigt werden, dass Glaukom PatientInnen im Vergleich mit der Kontrollgruppe vermehrt oxidiertes Albumin im GK aufwiesen. In der Literatur berichten zahlreiche Autoren über das vermehrte Auftreten von ROS im Rahmen der Ganglienzellapoptose bei GlaukompatientInnen; dass sich diese auch auf den GK auswirken, ist eine neue Erkenntnis. (32,61,71,76) Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit neben dem Redoxstatus von Albumin auch der GK Status bei GlaukompatientInnen erhoben. Hypothese dabei war, dass die ROS über eine Depolymerisation der Hyaluronsäure zu einer GK Verflüssigung bzw. GK Abhebung führen. Die Ergebnisse dieser Erhebung deuteten darauf hin, dass diese Hypothese zutreffend ist. Demnach könnte der GK Status bei der Diagnosefindung „Glaukom“ ein weiterer wichtiger hinweisgebender Faktor sein.

Diabetes

Bei GK Proben von Diabetikern fiel auf, dass weniger ASC im GK vorhanden war bzw. dass weniger Albumin im GK oxidiert war. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass ASC bei der ROS Entstehung im GK eine entscheidende Rolle spielt.

Eine ähnliche Situation konnte im Experimentiertteil durch die GK Filtration geschaffen werden. Im Überstand wurde die ASC Konzentration durch Filtration gesenkt, die

Konzentration von hochmolekularen Stoffen (wie bsp. Enzymen) wurde nicht beeinflusst. Als Folge reduzierte sich die Geschwindigkeit der Albuminoxidation signifikant.

Eine ähnliche Situation könnte im GK von Diabetikern stattfinden: Durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke reduziert sich die ASC Konzentration, während hingegen hochmolekulare Stoffe – wie antioxidativ wirkende Enzyme - im GK verbleiben. Diese Annahme erklärt, warum das Albumin in GK Proben von Diabetikern deutlich weniger oxidiert war.

Zusammengefasst behandelt diese Arbeit oxidative Vorgänge im GK aus 3 verschiedenen Blickwinkeln: Einem analytischen, einem experimentellen und einem klinischen. Es wurden die redoxabhängigen Albuminfraktionen aus Plasma und GK Proben gemessen, GK Proben experimentell behandelt und die klinischen Auswirkungen von oxidativem Stress auf den GK untersucht. Die überlappenden Phänomene der verschiedenen Untersuchungen wurden dabei verglichen und stützen bzw. bestätigen sich gegenseitig, sodass insgesamt eine Vielzahl von Aspekten der oxidativen Vorgänge im GK diskutiert bzw. beleuchtet werden konnte.

7 Literaturverzeichnis

References

- 1 Schwab C, Glatz W, Schmidt B, *et al.* Prevalence of posterior vitreous detachment in glaucoma patients and controls. *Acta Ophthalmologica* 2017;**95**(3):276-280.
- 2 Hogan M, Alvarado J, Weddell JE. In: WB Saunders, ed. *Histology of the human Eye*. Philadelphia; 1971.
- 3 Sebag J. In: Anonymous *The vitreous: Structure, Function, and Pathobiology*. New York: Springer Verlag; 1989.
- 4 Siegfried CJ, Shui YB, Holekamp NM, *et al.* Oxygen distribution in the human eye: relevance to the etiology of open-angle glaucoma after vitrectomy. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010;**51**(11):5731-5738.
- 5 Filas BA, Shui YB, Beebe DC. Computational model for oxygen transport and consumption in human vitreous. *Investigative ophthalmology & visual science* 2013;**54**(10):6549-6559.
- 6 Smelser G. In: Anonymous *The structure of the eye: Molecular morphology of the vitreous body*. New York: Academic Press; 1961.
- 7 Deguine V, Menasche M, Ferrari P, *et al.* Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous. *International journal of biological macromolecules* 1998;**22**(1):17-22.
- 8 Johnson MW. Posterior vitreous detachment: evolution and complications of its early stages. *American Journal of Ophthalmology* 2010;**149**(3):371-82.e1.
- 9 Le Goff MM, Bishop PN. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (London, England)* 2008;**22**(10):1214-1222.
- 10 Sebag J. In: Anonymous *Vitreous - in Health and Disease* . New York: Springer-Verlag; 2014.
- 11 Sebag J, Balazs EA. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Investigative ophthalmology & visual science* 1989;**30**(8):1867-1871.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 12 de Smet MD, Gad Elkareem AM, Zwinderman AH. The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease. *Ophthalmologica. Journal international d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 2013;**230**(4):165-178.
- 13 Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, *et al.* Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 1987;**28**(3):506-514.
- 14 Murthy KR, Goel R, Subbannayya Y, *et al.* Proteomic analysis of human vitreous humor. *Clinical proteomics* 2014;**11**(1):29-0275-11-29. eCollection 2014.
- 15 Skeie JM, Roybal CN, Mahajan VB. Proteomic insight into the molecular function of the vitreous. *PloS one* 2015;**10**(5):e0127567.
- 16 Yee KM, Feener EP, Madigan M, *et al.* Proteomic Analysis of Embryonic and Young Human Vitreous. *Investigative ophthalmology & visual science* 2015;**56**(12):7036-7042.
- 17 Clausen R, Weller M, Wiedemann P, *et al.* An immunochemical quantitative analysis of the protein pattern in physiologic and pathologic vitreous. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 1991;**229**(2):186-190.
- 18 Berman E, Voaden M. In: Anonymous *Biochemistry of the Eye: The vitreous body*. London: Academic Press; 1970.
- 19 Horn F. In: Anonymous *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*. : Thieme; 2009.
- 20 Löffler G, Petrides PE. In: Anonymous *Biochemie und Pathobiochemie*. : Springer Berlin Heidelberg; 2013.
- 21 Beebe DC, Holekamp NM, Siegfried C, *et al.* Vitreoretinal influences on lens function and cataract. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 2011;**366**(1568):1293-1300.
- 22 Shui YB, Holekamp NM, Kramer BC, *et al.* The gel state of the vitreous and ascorbate-dependent oxygen consumption: relationship to the etiology of nuclear cataracts. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 2009;**127**(4):475-482.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 23 Sebag J. Age-related changes in human vitreous structure. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 1987;**225**(2):89-93.
- 24 Chuo JY, Lee TY, Hollands H, *et al.* Risk factors for posterior vitreous detachment: a case-control study. *American Journal of Ophthalmology* 2006;**142**(6):931-937.
- 25 Schwab C, Ivastinovic D, Borkenstein A, *et al.* Prevalence of early and late stages of physiologic PVD in emmetropic elderly population. *Acta Ophthalmologica* 2012;**90**(3):e179-84.
- 26 Chattopadhyay D, Akiba J, Ueno N, *et al.* Metal ion catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: role of radicals and radical ions. *Ophthalmic research* 1992;**24**(1):1-7.
- 27 Couchouron T, Masson C. Early-onset progressive osteoarthritis with hereditary progressive ophthalmopathy or Stickler syndrome. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2011;**78**(1):45-49.
- 28 Snead MP, Yates JR. Clinical and Molecular genetics of Stickler syndrome. *Journal of medical genetics* 1999;**36**(5):353-359.
- 29 Stickler GB, Hughes W, Houchin P. Clinical features of hereditary progressive arthro-ophthalmopathy (Stickler syndrome): a survey. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2001;**3**(3):192-196.
- 30 Murali K, Kang D, Nazari H, *et al.* Spatial Variations in Vitreous Oxygen Consumption. *PloS one* 2016;**11**(3):e0149961.
- 31 Petropoulos IK, Pournaras JA, Stangos AN, *et al.* Preretinal partial pressure of oxygen gradients before and after experimental pars plana vitrectomy. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2013;**33**(1):170-178.
- 32 Ko ML, Peng PH, Ma MC, *et al.* Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free radical biology & medicine* 2005;**39**(3):365-373.
- 33 Ueno N. Changes in vitreous structure caused by oxygen free radicals. *Nippon Ganka Gakkai zasshi* 1995;**99**(12):1342-1360.
- 34 Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* 2003;**5**(5):557-561.
- 35 Harman D. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;**1067**:454-460.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 36 Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;**1067**:10-21.
- 37 Harman D. About "Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009". *Biogerontology* 2009;**10**(6):783-009-9253-z. Epub 2009 Oct 25.
- 38 Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* 2009;**10**(6):773-781.
- 39 Wentworth P,Jr, McDunn JE, Wentworth AD, *et al.* Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science (New York, N.Y.)* 2002;**298**(5601):2195-2199.
- 40 Li R, Meng X, Zhang Y, *et al.* Testosterone improves erectile function through inhibition of reactive oxygen species generation in castrated rats. *PeerJ* 2016;**4**:e2000.
- 41 Kumar A, Misra S, Kumar P, *et al.* Association between Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and risk of ischemic stroke in North Indian population: a case-control study. *Neurological research* 2016;:1-5.
- 42 Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & redox signaling* 2007;**9**(2):233-244.
- 43 Raizman N. Scurvy How a surgeon, a mariner, and a gentleman solved the greatest medical mystery of the age of sail. *Journal of Clinical Investigation* 2004;**114**(12):1690.
- 44 Simon HB. In: Anonymous *The Harvard Medical School guide to men's health.* : Simon and Schuster; 2002.
- 45 Lind J. In: Anonymous *A Treatise on the Scurvy.* : S. Crowder; 1772.
- 46 Lind J. In: Anonymous *A Treatise on the Scurvy: In Three Parts, Containing an Inquiry Into the Nature, Causes, and Cure, of that Disease.* : A. Millar; 1757.
- 47 Claridge JA, Fabian TC. History and development of evidence-based medicine. *World journal of surgery* 2005;**29**(5):547-553.
- 48 Bourdon E, Blache D. The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxidants & redox signaling* 2001;**3**(2):293-311.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 49 Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, *et al.* Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radical Biology and Medicine* 2003;**34**(12):1563-1574.
- 50 Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, *et al.* Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2008;**1782**(7):469-473.
- 51 Oettl K, Reibnegger G, Schmut O. The redox state of human serum albumin in eye diseases with and without complications. *Acta Ophthalmologica* 2011;**89**(2):e174-e179.
- 52 Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, *et al.* Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2008;**1782**(7):469-473.
- 53 Roche M, Rondeau P, Singh NR, *et al.* The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters* 2008;**582**(13):1783-1787.
- 54 Taverna M, Marie AL, Mira JP, *et al.* Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of intensive care* 2013;**3**(1):4-5820-3-4.
- 55 Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British journal of pharmacology* 2007;**151**(5):580-590.
- 56 Sies H. Anonymous What is oxidative stress? In: *Oxidative Stress and Vascular Disease* : Springer; 2000: 1-8.
- 57 Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992;**669**(1):7-20.
- 58 Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, *et al.* Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *European journal of clinical investigation* 1997;**27**(2):141-147.
- 59 Bhuyan KC, Bhuyan DK, Podos SM. Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life Sciences* 1986;**38**(16):1463-1471.
- 60 Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice Neurology* 2008;**4**(11):600-609.
- 61 Mousa A, Kondkar AA, Al-Obeidan SA, *et al.* Association of total antioxidants level with glaucoma type and severity. *Saudi medical journal* 2015;**36**(6):671-677.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 62 Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Progress in retinal and eye research* 2006;**25**(5):490-513.
- 63 Lu L. Stress-induced corneal epithelial apoptosis mediated by K(+) channel activation. *Progress in retinal and eye research* 2006;**25**(6):515-538.
- 64 McGahan MC. Ascorbic acid levels in aqueous and vitreous humors of the rabbit: effects of inflammation and ceruloplasmin. *Experimental eye research* 1985;**41**(3):291-298.
- 65 Grujicic D, Pesic B. Reaction and nucleation mechanisms of copper electrodeposition from ammoniacal solutions on vitreous carbon. *Electrochimica Acta* 2005;**50**(22):4426-4443.
- 66 Hu D, McCormick SA. Progress in the studies of etiology, epidemiology and pathogenesis of ocular melanomas. *Eye science* 2011;**26**(1):18-22.
- 67 - Rajesh M, - Sulochana K, - Coral K, *et al.* - Determination of Carbonyl Group Content in Plasma Proteins as a Useful Marker to Assess Impairment in Antioxidant Defense in Patients with Eales' Disease. - *Indian Journal of Ophthalmology* 2004;- **52**(- 2):- 139-- 44.
- 68 Lykkesfeldt J. Measurement of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *Current protocols in toxicology* 2002;**Chapter 7**:Unit 7.6.1-15.
- 69 Lykkesfeldt J, Loft S, Poulsen HE. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection--are they reliable biomarkers of oxidative stress? *Analytical Biochemistry* 1995;**229**(2):329-335.
- 70 Levine M, Wang Y, Rumsey SC. Analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples. *Methods in enzymology* 1999;**299**:65-76.
- 71 Doucette LP, Rasnitsyn A, Seifi M, *et al.* The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. *Survey of ophthalmology* 2015;**60**(4):310-326.
- 72 Greenwald RA, Moy WW. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis and Rheumatism* 1980;**23**(4):455-463.
- 73 Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Seminars in cell & developmental biology* 2001;**12**(6):449-457.
- 74 Pahrudin Arrozi A, Wan Ngah WZ, Mohd Yusof YA, *et al.* Antioxidant modulation in restoring mitochondrial function in neurodegeneration. *The International journal of neuroscience* 2016;:1-43.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 75 Porpino SK, Zollbrecht C, Peleli M, *et al.* Nitric oxide generation by the organic nitrate NDBP attenuates oxidative stress and angiotensin II-mediated hypertension. *British journal of pharmacology* 2016;.
- 76 Osborne NN. Pathogenesis of ganglion "cell death" in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. *Progress in brain research* 2008;**173**:339-352.
- 77 Koide K, Zhang XM, Ohishi K, *et al.* Ascorbic acid concentration in rabbit vitreous measured by microdialysis with HPLC-electrochemical detection before and after vitreous surgery. *Experimental eye research* 2006;**82**(5):868-873.
- 78 Li Q, Yan H, Ding TB, *et al.* Oxidative responses induced by pharmacologic vitreolysis and/or long-term hyperoxia treatment in rat lenses. *Current eye research* 2013;**38**(6):639-648.
- 79 Pfreundschuh M, Aepfelbacher M. In: Anonymous *Pathophysiologie, Pathobiochemie: mit 112 Tabellen.* : Elsevier, Urban & Fischer; 2004.
- 80 Zhang XM, Ohishi K, Hiramitsu T. Microdialysis measurement of ascorbic acid in rabbit vitreous after photodynamic reaction. *Experimental eye research* 2001;**73**(3):303-309.
- 81 Silbernagl S, Lang F. In: Anonymous *Taschenatlas der Pathophysiologie.* : Thieme; 2013.
- 82 Hofmann H, Schmut O. The inability of superoxide dismutase to inhibit the depolymerization of hyaluronic acid by ferrous ions and ascorbate. *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 1980;**214**(3):181-185.
- 83 DiMattio J. A comparative study of ascorbic acid entry into aqueous and vitreous humors of the rat and guinea pig. *Investigative ophthalmology & visual science* 1989;**30**(11):2320-2331.
- 84 Jongebloed WL, Worst JF. The cisternal anatomy of the vitreous body. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 1987;**67**(1-2):183-196.
- 85 Sebag J. Ageing of the vitreous. *Eye (London, England)* 1987;**1 (Pt 2)**(Pt 2):254-262.
- 86 Hanashima C, Namiki H. Reduced viability of vascular endothelial cells by high concentration of ascorbic acid in vitreous humor. *Cell biology international* 1999;**23**(4):287-298.
- 87 Garcia-Medina JJ, Garcia-Medina M, Garrido-Fernandez P, *et al.* A two-year follow-up of oral antioxidant supplementation in primary open-angle glaucoma: an open-label, randomized, controlled trial. *Acta Ophthalmologica* 2014;.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 88 Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, *et al.* Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *European journal of clinical investigation* 1997;**27**(2):141-147.
- 89 Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 2016;**24**(5):547-553.
- 90 Takano S, Ishiwata S, Nakazawa M, *et al.* Determination of ascorbic acid in human vitreous humor by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Current eye research* 1997;**16**(6):589-594.
- 91 Panova IG, Sharova NP, Dmitrieva SB, *et al.* Characterization of the composition of the aqueous humor and the vitreous body of the eye of the frog *Rana temporaria* L. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 2008;**151**(4):676-681.
- 92 Cederlund M, Ghosh F, Arner K, *et al.* Vitreous levels of oxidative stress biomarkers and the radical-scavenger alpha1-microglobulin/A1M in human rhegmatogenous retinal detachment. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2013;**251**(3):725-732.
- 93 Delyfer MN, Raffelsberger W, Mercier D, *et al.* Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death. *PloS one* 2011;**6**(12):e28791.
- 94 Huang W, Li G, Qiu J, *et al.* Protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment. *PloS one* 2013;**8**(9):e75735.
- 95 Awh CC, Zanke BW. Re: Chew *et al.*: No clinically significant association between CFH and ARMS2 genotypes and response to nutritional supplements: AREDS report number 38 (Ophthalmology 2014;121:2173-80). *Ophthalmology* 2015;**122**(8):e46.
- 96 Chew EY, Klein ML, Clemons TE, *et al.* Genetic testing in persons with age-related macular degeneration and the use of the AREDS supplements: to test or not to test? *Ophthalmology* 2015;**122**(1):212-215.
- 97 Glaser TS, Doss LE, Shih G, *et al.* The Association of Dietary Lutein plus Zeaxanthin and B Vitamins with Cataracts in the Age-Related Eye Disease Study: AREDS Report No. 37. *Ophthalmology* 2015;**122**(7):1471-1479.

Oxidativer Stress im Glaskörper

- 98 Schmut O, Hofmann H. The change of hyaluronic acid of the vitreous humour by oxidation-reduction-systems (author's transl). *Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie*. *Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 1976;**201**(2):169-174.
- 99 Kanski JJ. In: Anonymous *Klinische Ophthalmologie: Lehrbuch und Atlas*. : Elsevier Health Sciences Germany; 2012.
- 100 Heegaard S, Jensen OA, Prause JU. Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. SEM on frozen resin-cracked and enzyme-digested retinas of *Macaca mulatta*. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 1986;**224**(4):355-360.
- 101 Uchino E, Uemura A, Ohba N. Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 2001;**119**(10):1475-1479.
- 102 Hayreh SS, Jonas JB. Posterior vitreous detachment: clinical correlations. *Ophthalmologica*. *Journal international d'ophtalmologie*. *International journal of ophthalmology*. *Zeitschrift für Augenheilkunde* 2004;**218**(5):333-343.
- 103 Weber-Krause B, Eckardt C. Incidence of posterior vitreous detachment in the elderly. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 1997;**94**(9):619-623.
- 104 Garbe C, Buttner P, Weiss J, *et al*. Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentigines: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *The Journal of investigative dermatology* 1994;**102**(5):700-705.
- 105 Ivastinovic D, Schwab C, Borkenstein A, *et al*. Evolution of early changes at the vitreoretinal interface after cataract surgery determined by optical coherence tomography and ultrasonography. *American Journal of Ophthalmology* 2012;**153**(4):705-709.
- 106 Murali K, Kang D, Nazari H, *et al*. Spatial Variations in Vitreous Oxygen Consumption. *PloS one* 2016;**11**(3):e0149961.

ⁱ Bildquelle: Internet 12.12.2016: <https://de.wikipedia.org/wiki/Ascorbinsäure>

ⁱⁱ Bildquelle: Das Bild wurde anhand der Daten von Curry S et al (Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. Nat Struct Biol. 1998;5(9):827-35) mit dem Programm Jmol (an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org>) erstellt.