

Dr. rer. nat. Andreas Berke

Freie Radikale und Hornhaut

Die Hornhaut ist nicht nur ein transparentes Fenster, durch das Licht ins Auge hineingelangen kann; sie ist auch ein Schutzfilter, das den größten Teil der auf das Auge gelangenden Ultraviolettstrahlung absorbiert. Ultraviolett gilt als eine der wichtigsten Ursachen für die Entstehung freier Radikale. Im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben weist die Hornhaut ausgesprochen starke tageszeitliche Schwankungen der Sauerstoffversorgung auf. Während sie am Tage optimal ist, fällt die Sauerstoffversorgung während des Schlafs auf niedrige Werte ab. Es ist bekannt, dass starke Schwankungen des Sauerstoffangebotes ebenfalls die Entstehung freier Radikale begünstigen. Die Hornhaut ist den Belastungen der freien Radikale nicht schutzlos ausgeliefert. Die Apoptose des Epithels, ein hoher Gehalt an Superoxid-Dismutase, einem körpereigenen Schutzmolekül gegen freie Sauerstoffradikale, die Katalase sowie Ascorbinsäure gewährleisten unter normalen Bedingungen einen guten Schutz gegen freie Radikale. Auch der Tränenfilm verfügt mit der Harnsäure, der Aminosäure Tyrosin sowie der Ascorbinsäure und Glutathion über wirksame Antioxidantien.

Glossar

Dehydrogenase: Enzyme, die die Übertragung von Wasserstoff katalysieren.

Dismutation: Reaktion, die eine Verbindung mittlerer Oxidationszahl in eine Verbindung mit höherer oder niedrigerer Oxidationszahl überführt

Nitrierung: Einfügen einer Nitrogruppe (-NO₂) in eine organische Verbindung.

Oxidase: Enzyme, die eine Redox-Reaktion mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor katalysieren. Früher war Oxidase die Bezeichnung für Enzyme, die die Oxidation von biologischen Verbindungen katalysieren.

Oxidation: im engeren Sinne die Aufnahme von Sauerstoff durch chemische Elemente oder Verbindungen. Im weiteren Sinne bedeutet Oxidation die Abgabe von Elektronen von Elementen, Ionen oder Verbindungen, sodass sich deren Oxidationszahl erhöht. (Fe(II) → Fe(III)). Die abgegebenen Elektronen werden von anderen Substanzen, den Oxidationsmitteln oder Oxidantien aufgenommen, die dadurch reduziert werden. Die Oxidation einer Substanz läuft also immer gleichzeitig mit der Reduktion einer anderen Substanz ab.

Peroxid: Verbindungen des als Peroxo-Gruppe (-O-O-) vorliegenden Sauerstoffs mit Wasserstoff (→ Wasserstoffperoxid), Metallen (→ z.B. Na₂O₂) oder mit organischen Resten (→ z.B. Lipidperoxidation).

Peroxidase: Enzyme, die Substrate unter Verwendung von Wasserstoffperoxid oxidieren. Das Wasserstoffperoxid wird dadurch zu Wasser reduziert.

Peroxidation: Aufnahme einer Peroxo-Gruppe (-O-O-) in ein Molekül.

Redox-Reaktion: Reaktion, bei der eine Substanz oxidiert wird und die dabei abgegebenen Elektronen eine zweite Substanz, die diese Elektronen aufnimmt, reduziert wird. Es besteht ein Gleichgewicht entsprechend folgenden Reaktionsschemas:

Reduktionsmittel → Oxidationsmittel + Elektronen

Reduktion: im engeren Sinne die Entfernung von Sauerstoff aus einer chemischen sauerstoffhaltigen Verbindung. Im weiteren Sinne stellt die Reduktion die Aufnahme eines Elektrons von Elementen, Ionen oder chemischen Verbindungen. Durch die Reduktion wird die Oxidationszahl erniedrigt (Fe(III) → Fe(II)).

Superoxid: ältere Bezeichnung für Peroxide.

1. Chemische und physikalische Grundlagen

In der Chemie werden Molekülgruppe mit einem oder mehreren unpaaren Elektronen als freie Radikale bezeichnet. Von besonderer Bedeutung sind in biologischen Systemen die freien Radikale des Sauerstoffs und Stickstoffs.

Zwei Radikale haben das Bestreben ihre unpaaren Elektronen durch Ausbildung einer chemischen Bindung mit einander zu kombinieren. Sie sind auch zur Bindung mit anderen Molekülen in der Lage. Die Elektronenpaarung lässt verschiedene Reaktionswege zu. Eine Radikalkombination ist eine stabile Bindung zwischen zwei Radikalen. Die Reaktionsfreudigkeit freier Radikale lässt sich direkt an der Halbwertszeit der freien Radikale ablesen. Je kürzer die Halbwertszeit ist, desto reaktionsfreudiger ist das Radikal.

Freies Radikal	Halbwertszeit (s)
Hydroxylradikal (OH [•])	10 ⁻⁹
Singulett-Sauerstoff	10
Stickstoffmonoxid-Radikal(NO [•])	7
Peroxylradikal (ROO [•])	1–10

Tabelle 1: Reaktionsgeschwindigkeit freier Radikale

Eine Wasserstoffabstraktion liegt vor, wenn von einem Molekül (z.B. DNA) ein Wasserstoff entfernt wird. Die Anlagerung von freien Radikalen an Doppelbindungen, wie sie besonders zahlreich in den freien Fettsäuren der Zellmembranen vorliegen, wird als Addition bezeichnet. Schließlich können bei Anwesenheit von Metallionen im Rahmen so genannter Redox-Reaktionen Elektronen übertragen werden.

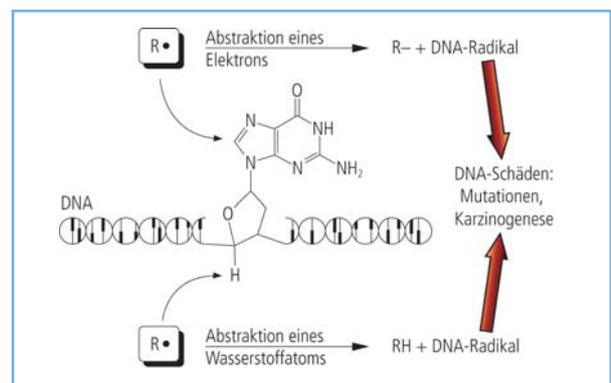


Abb. 1: Schädigung der DNA durch freie Radikale

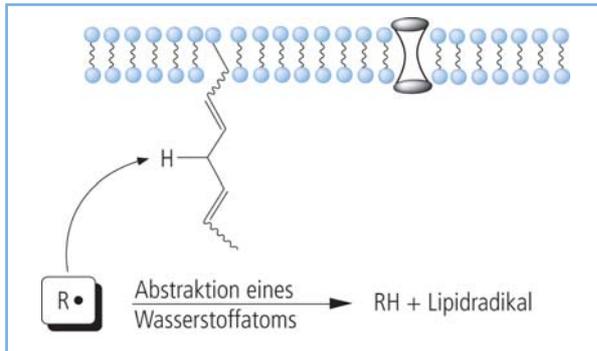


Abb. 2: Schädigung der Lipide durch freie Radikale

Durch Autokatalyse kann sich die Zahl der freien Radikale selbständig erhöhen. Dies ist besonders bei Beteiligung von Sauerstoff der Fall. Die freien Radikale katalysieren dann die Entstehung neuer freier Radikale. Lipidradikale, die aus der Schädigung von Lipiden der Zellmembranen hervorgegangen sind, können ihre eigene Vermehrung katalysieren. Durch freie Radikale hervorgerufene Schäden an der Erbinformation und der Zellmembran sind für den Tod der Zelle verantwortlich. Diese Zellschäden sind für die pathologischen Veränderungen von Geweben und Organen verantwortlich. Das Altern ist wesentlich eine Folge der Wirkung freier Radikale auf die Zellen des Körpers.

Organ	Erkrankung
Zentralnervensystem	Alzheimersche Erkrankung
	Parkinsonsche Erkrankung
	Schlaganfall
	Gehirntrauma
	Manisch-depressive Erkrankungen
Magen und Darm	Peptisches Ulkus
	Akute Pankreatitis
	Morbus Crohn
	Colitis ulcerosa
	Strahlenschäden des Darms
Herz-Kreislaufsystem	Atherosklerose
	Arteriosklerose
	Arterielle Hypertonie
	Herzinfarkt
	Kardiomyopathie
Auge	Glaukom
	Katarakt
	Netzhautablösungen
	Retrolentale Fibroplasie
	Entzündungen des Auges
Leber	Alkoholbedingte Schäden
	Arzneimittelbedingte Schäden
	Morbus Wilson
Atemwege	ARDS
	Bronchialasthma
	Lungenemphysem
	Silikose und Asbestose
Immunsystem	Lupus erythematoses
	Rheumatoide Arthritis

Tabelle 2: Erkrankungen, an denen freie Radikale beteiligt sind.

Nahezu jede Körperzelle ist den Belastungen durch freie Radikale ausgesetzt. Daher haben sich verschiedene Schutzmechanismen herausgebildet, um die schädigenden Wirkungen der freien Radikale zu verhindern. Antioxidantien kontrollieren die Konzentration freier Radikale, indem sie entweder mit den freien Radikalen selbst oder deren Vorstufen (Prooxidantien) reagieren. Die Wirkung der Antioxidantien, zu denen u.a. in der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit Vitamin E, Harnsäure, Vitamin C und Glutathion zählen, entspricht denen der freien Radikale selbst, nur das sie ihre Wirkung nicht gegen biologische Moleküle sondern gegen freie Radikale ausüben. So entfernt Vitamin E Wasserstoffatome von freien Radikalen, Vitamin C kann durch Redox-Reaktionen Elektronentransporte an den freien Radikalen ablaufen lassen. Weiterhin verfügen Körperzellen auch über Enzyme wie Dismutasen, Peroxidasen oder Katalasen, die entstandene reaktionsfreudige Sauerstoffradikale zu harmloseren Verbindungen umbauen können.

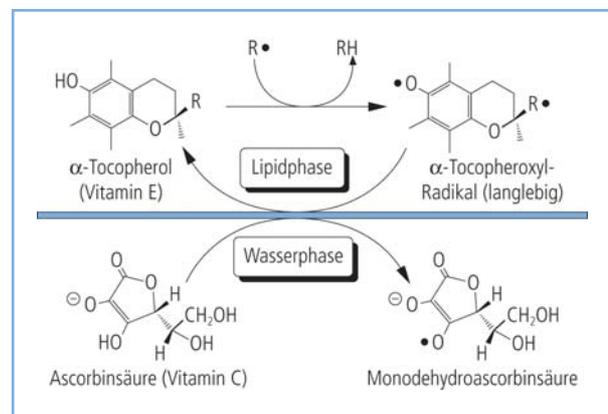


Abb. 3: Wirkmechanismen der Antioxidantien Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C)

Freie Radikale sind nicht grundsätzlich schädlich für die Körperzellen. Zahlreiche Stoffwechselreaktionen sind auf die Anwesenheit freier Radikale angewiesen. Sie sind für die Zellen unverzichtbar. Ihre Bildung muss aber, um Zellschäden bei erhöhten Konzentrationen zu verhindern, einer strengen Kontrolle unterliegen. Als oxidativer Stress wird das Überwiegen von freien Radikalen bzw. ihrer Prooxidantien gegenüber den sie abbauenden Antioxidantien bezeichnet.

2. Freie Radikale und vorderes Auge

Zu den freien Radikalen, die am vorderen Auge von großer Bedeutung sind, zählen aus Stickstoff und Sauerstoff hervorgegangene Radikale. Die folgenden Ausführungen beschränken sich daher auf freie Radikale des Sauerstoffs und Stickstoffs. Sie entstehen teilweise in physiologischen Prozessen sowie unter äußeren Einflüssen.

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Verändert ein Molekül oder ein Atom seine Oxidationszahl, indem es beispielsweise ein Elektron aufnimmt, so spricht man von einer Dismutation. Durch schrittweise Übertragung von vier Elektronen auf ein Sauerstoffmolekül kann es zur Bildung verschiedener, so genannten reaktiver Sauerstoff-Spezies (Reactive Oxygene Species = ROS) kommen, die alle über cytotoxische Eigenschaften verfügen.

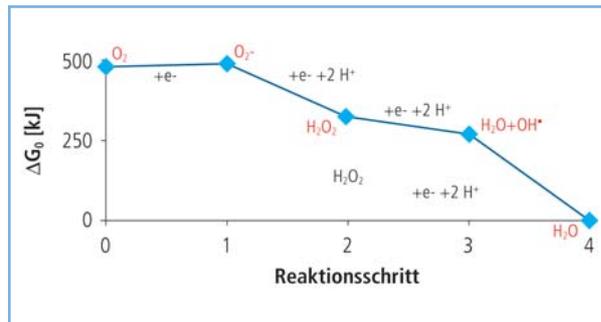
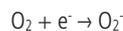
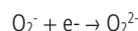


Abb. 4: Reaktionskette, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt. Lediglich der erste Schritt dieser Kette, die Bildung des Superoxid-Anions bedarf der Zufuhr von Energie. Alle anderen Reaktionen laufen spontan ab. Die übertragenen Elektronen stammen von Metallionen.

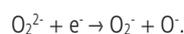
Nimmt ein neutrales Sauerstoffmolekül zunächst ein Elektron auf, so entsteht hierdurch ein Superoxid-Anion O_2^- .



Dieses Superoxid-Radikal ist sehr reaktionsfreudig. Ein weiterer Reduktionsschritt führt dazu, dass ein weiteres Elektron auf das Superoxid-Anion übertragen wird. Es entsteht dann entsprechend der folgenden Reaktion



ein Peroxid-Anion (O_2^{2-}), das durch Aufnahme von zwei Protonen leicht in einer Nebenreaktion zu dem vergleichsweise harmlosen Wasserstoffperoxid umgewandelt werden kann. Wird nun ein drittes Elektron auf das Peroxid-Anion übertragen, so zerfällt dieses in



Lagern sich an O^{2-} -zwei Protonen an, so entsteht Wasser. Die Anlagerung eines Protons an O^- liefert das besonders aggressive Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet). Wird schließlich ein viertes Elektron auf das Hydroxyl-Radikal übertragen, so entsteht, nachdem ein weiteres Proton übertragen wurde, auch aus O^- Wasser.

Molekularer Sauerstoff ist auf Grund seiner Elektronenkonfiguration, die in zwei ungepaarten Elektronen mit parallelem Spin besteht, wenig reaktiv. Daher ist der erste Schritt bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die Bildung des Superoxid-Anions, auf die Zufuhr von Energie angewiesen. Die folgenden Reaktionsschritte sind energieunabhängig und können daher spontan ablaufen. Sie setzen lediglich einen Elektronendonator voraus. In biologischen Systemen liefern Eisen (Fe^{2+}) und Kupfer (Cu^+) die erforderlichen Elektronen.

2.2 Stickstoff

Neben Sauerstoff ist Stickstoff das zweite wichtige Molekül, das Ausgangssubstanz für die Bildung freier Radikale ist. Über die Bildung des physiologisch bedeutsamen Stickstoffmonoxids können Peroxynitrit-Radikale mit hohem zellschädigendem Potenzial gebildet werden.

2.2.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO), ein sehr kurzlebiges und potenziell toxisches Radikal, spielt eine ambivalente Rolle. Einerseits ist es als intrazellulä-

rer Botenstoff an zahlreichen physiologischen Prozessen im Körper entscheidend beteiligt, andererseits kann es Ausgangspunkt für die Bildung von Peroxynitrit sein, einem äußerst reaktionsfreudigen und toxischen Radikal.

Stickstoffmonoxid wird aus L-Arginin unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthase (NOS) gebildet. Im Körper sind 3 Formen der NO-Synthase nachgewiesen. NOS-I, die in den Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems vorliegt, und NOS-III, das in Endothelzellen von Blutgefäßen vorkommt, sind immer verfügbar. Sie stellen die konstitutiven NO-Synthasen (cNOS) dar (Kim et al., 2002). NOS-I wurde auch auf den Nervenendigungen der Tränendrüse nachgewiesen, weshalb davon auszugehen ist, dass NO auch regulierend an der Tränenproduktion beteiligt ist (Ding et al., 2002).

NOS-II hingegen wird bei Abwehrreaktionen gegen eingedrungene Krankheitserreger aktiviert. Diese NO-Synthase wird daher auch als induzierbare NO-Synthase (iNOS) bezeichnet. Sie produziert weit größere Mengen an NO als cNOS. Das durch iNOS produzierte Stickstoffmonoxid entfaltet seine cytotoxische und cytostatische Wirkung aber nicht nur gegen Krankheitserreger sondern auch gegen gesunde Zellen. Stickstoffmonoxid kann in der Hornhaut eine Nekrose der Zellen durch Schädigungen des Zellkerns und Schwellung der Mitochondrien hervorrufen.

Die konstitutiven NO-Synthasen sind bei einer gesunden Hornhaut nur in geringen Mengen nachweisbar. NOS-II ist hier gar nicht nachweisbar (Kim et al., 2002). Alle drei Formen der NOS sind aber bei Entzündungen oder Verletzungen der Hornhaut, allergischen Reaktionen der Bindehaut sowie Entzündungen der Uvea nachweisbar. In den Keratozyten des Stromas wird, nachdem diese durch Zytokine (IL-1 β , TNF- α , LPS) stimuliert worden sind, NOS-II gebildet (Dighiero et al., 1999). Eine weitere Quelle für Stickstoffmonoxid können die im Zuge von Entzündungsreaktionen in die Hornhaut eingewanderten Immunzellen wie Monozyten und Neutrophile sein. Besonders beim Keratoconus wurden größere Konzentrationen der induzierbaren NO-Synthase nachgewiesen. (Brown et al., 2004; Buddi et al., 2002).

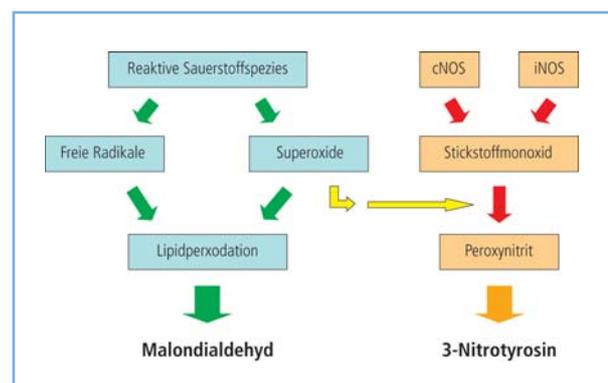
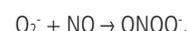


Abb. 5: Reaktionswege zur Bildung freier Radikale und ihrer Indikatormoleküle Malondialdehyd und 3-Nitrotyrosin. iNOS: induzierbare NO-Synthase, cNOS: konstitutive NO-Synthase

2.2.2 Peroxynitrit

Stickstoffmonoxid, das in der Hornhaut gebildet wird, geht mit Superoxid-Anionen eine Verbindung ein. Es entsteht Peroxynitrit



Die Umwandlung der reaktiven, instabilen Radikale Superoxid-Anionen und Stickstoffmonoxid erfolgt rund dreimal schneller als die Umwandlung von O_2^- zu Wasserstoffperoxid durch das Schutzmolekül Superoxid-Dismutase. Durch diese schnelle Umwandlung des Stickstoffmonoxids können die physiologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid stark gehemmt werden.

Peroxynitrit ist in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen. Beim Zerfall von Peroxynitrit sind verschiedene Oxidations- und Nitrierungsreaktionen möglich. Die bedeutsamste Reaktion ist die Umwandlung der Aminosäure Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin. Diese Substanz gilt als Marker dafür, dass in der Zelle Peroxynitrit vorgelegen haben muss.

Peroxynitrit kann Schädigungen der DNA und RNA hervorrufen. So werden die in der DNA enthaltenen Basen Adenin und Guanin unter Beteiligung von Peroxynitrit zu NitroAdenin und Nitroguanin umgewandelt. Die Folge dieser Veränderungen können Strangbrüche und Mutationen der DNA sein.

Proteine werden durch Nitrierung der Aminosäure Tyrosin geschädigt. Strukturproteine wie beispielsweise die Kollagene des Hornhautstromas gelten ebenso wie die DNA als wichtige Angriffsstrukturen des Peroxynitrits. Die Polymerstruktur dieser Proteine wird durch die Nitrierung so verändert, dass das Kollagen leichter durch aktivierte Proteasen geschädigt werden kann.

Auch ein niedriger Gehalt an Peroxynitrit kann, wenn er lange genug vorliegt, die Apoptose auslösen. Hierdurch bedingt kommt es zu einem vorzeitigen Verlust von Zellen der Hornhaut.

3. Entstehung freier Radikale

Die Bildung von Superoxid kann durch verschiedene Prozesse gesteigert werden. Die Reperfusion nach Phasen von Sauerstoffmangel, die Phagozytose durch Makrophagen, zur Abwehr eingedrungener Krankheitserreger, Entzündungsreaktionen oder UV-Strahlung seien als mögliche Auslöser der Bildung von Superoxid hier angeführt.

3.1 UV-Strahlung

Ein Superoxid-Anion kann unter dem Einfluss von UV-Strahlung durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff gewonnen werden. In der Hornhaut wirken verschiedene Aminosäuren (Tryptophan, Histidin, Cystein, Methionin) sowie das am Wasserstofftransport in der Zelle beteiligte Riboflavin, ein Bestandteil des Vitamin B2 Komplexes, fotosensibilisierend. Diese Substanzen absorbieren optische Strahlung und zwar bevorzugt Ultraviolett. Hierdurch werden sie in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die dabei freiwerdende Energie dazu benutzt, ein Elektron auf Sauerstoff zu übertragen. Es entsteht dabei ein Superoxid-Anion. Durch UVB kann auch die Xanthinoxidase stimuliert werden, sodass durch katalytische Wirkung ebenfalls vermehrt Superoxid-Anionen gebildet werden (siehe 3.5.2).

3.2 Stoffwechselprozesse

Sauerstoff ist eines der aggressivsten chemischen Elemente in der Natur. Der Zelle gelingt es die toxischen Wirkungen des Sauerstoffs dadurch zu umgehen, dass bei der Zellatmung Sauerstoff durch Übertragen von Protonen zu Wasser reduziert wird. Als positive Nebenwirkung wird dabei Energie in Form von ATP gewonnen. Nur rund 2 % des in die Zelle aufgenommenen Sauerstoffs werden nicht zu Wasser reduziert, sondern gelangen überwiegend als Superoxid-Anion in den Organismus. Die so entstandenen freien Sauerstoff-Radikale werden für die katalytische Wirkung verschiedener Enzyme erforderlich.

Weiterhin sind im Organismus andere physiologische Quellen freier Radikale vorhanden.

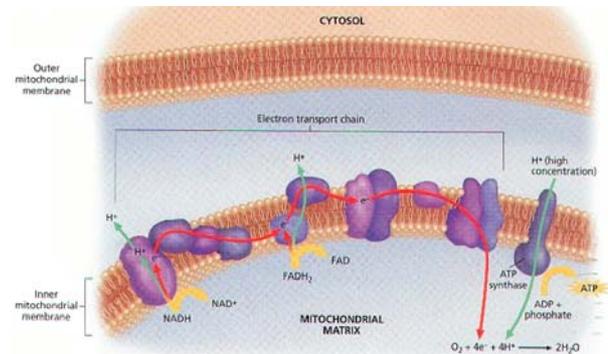


Abb. 6: Elektronentransportkette in der inneren Membran der Mitochondrien. Am Ende der Reaktionsschritte (Zellatmung) steht die Bildung von Wasser. Rund 98 % des Sauerstoffs der Zelle werden auf diesem Wege zu Wasser reduziert. 2 % des Sauerstoffs werden zu reaktiven Sauerstoffspezies umgewandelt.

Reaktive Sauerstoff-Spezies werden auch ständig durch Reaktion von Sauerstoff mit dem in allen Zellen vorhandenen FMN (Flavinmononucleid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinucleotid) gebildet. Beide Substanzen, die an zahlreichen Stoffwechselreaktionen im Körper, darunter auch in der Atmungskette (Zellatmung) als Co-Faktoren beteiligt sind, können bei ihrer Reduktion zwei Protonen und zwei Elektronen aufnehmen und an andere Moleküle übertragen.

Eine Steigerung des Zellstoffwechsels, wie sie beispielsweise bei der Schilddrüsenüberfunktion unter dem Einfluss des Schilddrüsenhormons Thyroxin möglich ist, geht in der Regel mit einem Mangel des Schutzmoleküls Glutathion (siehe 5.3) her. Es kommt daher zu einer Anreicherung von Wasserstoffperoxid.

3.3 Metabolic Burst

Die Phagozytose ist ein wichtiger Baustein in der unspezifischen Immunabwehr des äußeren Auges. Makrophagen (Monozyten, PMN-Zellen) können eingedrungene Mikroorganismen und Fremdkörper in sich aufnehmen und anschließend zerstören. Beim geschlossenen Auge wandern PMN-Zellen nach wenigen Stunden in den Tränenfilm ein. Ihre Aufgabe ist es, die Zahl der unter den Lidern eingeschlossenen Bakterien auf ein niedriges Niveau herabzusetzen, sodass die Hornhaut während des Schlafs trotz fehlenden Lidschlags keinem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt ist. Bei Infektionen und Entzündungen von Bindehaut und Hornhaut wandern vermehrt Entzündungszellen ein, die ebenso wie die PMN-Zellen in der Lage sind, freie Sauerstoffradikale zu bilden. Diese Sauerstoffradikale beseitigen nicht nur eingedrungene Krankheitserreger; sie können auch die Augenoberfläche schädigen.

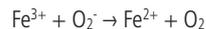
Tritt ein Makrophage mit einer Bakterienzelle in Kontakt, so kommt es zu Veränderungen der Zellmembran der Makrophagen. Die Folge ist ein deutlicher Anstieg der Stoffwechselaktivität dieser Zellen verbunden mit einem drastischen Anstieg der Sauerstoffaufnahme durch die Zelle. Der Sauerstoff wird aber nun nicht primär zur aeroben Energiegewinnung herangezogen sondern zur Bildung von Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid. Dieses Phänomen ist als «Metabolic Burst» bekannt. Beteiligt an diesen Reaktionen sind die Elektronenüberträger NADH und NADPH. Makrophagen verfügen über das Enzym NADH-Oxidase, das die Bildung von Superoxid-Anionen stimuliert.

3.4 Eisen und reaktive Sauerstoff-Spezies

Die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies wird durch Eisen-Ionen beeinflusst. Hier ist die Fenton-Reaktion, bei der aus dem vergleichsweise harmlosen Wasserstoffperoxid das hochreaktive Hydroxyl-Radikal OH^\bullet entsteht,



zu nennen. Dreiwertiges Eisen wird schließlich über die Haber-Weiß-Reaktion unter Einsatz eines Superoxid-Anions



zurückgewonnen. Das an der Fenton-Reaktion beteiligte Wasserstoffperoxid kann aus dem Superoxid-Anion durch weitere Aufnahme von Elektronen entstanden sein, es kann aber auch über eine Kontaktlinse, die sich in einer Wasserstoffperoxid-Lösung befunden hat und nicht ausreichend neutralisiert wurde, an das Auge gelangen.

Durch Bindung von Eisen an eisenbindende Moleküle wie Laktoferrin und Transferrin kann die durch Eisen vermittelte Bildung des äußerst aggressiven freien Hydroxyl-Radikals eingeschränkt werden.

3.5 Sauerstoffmangel

Sauerstoffmangel gilt als einer der wesentlichen Stressfaktoren, der zur Bildung von Superoxid-Anionen führen kann. Unter diesem Gesichtspunkt gilt auch die Kontaktlinse als ein möglicher Auslöser von oxidativem Stress an der Augenoberfläche. Ein Stressfaktor ist sicherlich auch die Tatsache, dass die Sauerstoffversorgung des vorderen Auges deutlichen tageszeitlichen Veränderungen unterworfen ist. Bei geschlossenem Auge erhält die Hornhaut nur ein Drittel der Sauerstoffmenge, die diese bei geöffneten Lidern erhält.

3.5.1 Nichtenzymatische Bildung von Superoxid-Anionen

Die aerobe Energiegewinnung, bei der ATP in der Zelle durch Reduktion von Sauerstoff zu Wasser gewonnen wird, basiert auf einer Abfolge von verschiedenen Elektronen- und Protonentransportmolekülen. In mehreren Schritten werden so Elektronen und Protonen auf Sauerstoff übertragen. Die Elektronentransportkette besteht aus drei in der Innenwand der Mitochondrien gebundenen Proteinkomplexen (Komplex I, III und IV) und zwei frei beweglichen Transportmolekülen, dem Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c.

Bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen wird der Elektronentransport am Komplex IV gestoppt. Es gelangen aber stetig Elektronen in die Transportkette. Diese Elektronen werden am Komplex III auf Sauerstoff übertragen, sodass hier Superoxid-Anionen entstehen. Dieser Entstehungsweg für Superoxid ist auch noch bei niedrigen Konzentrationen von 10^{-6} M möglich.

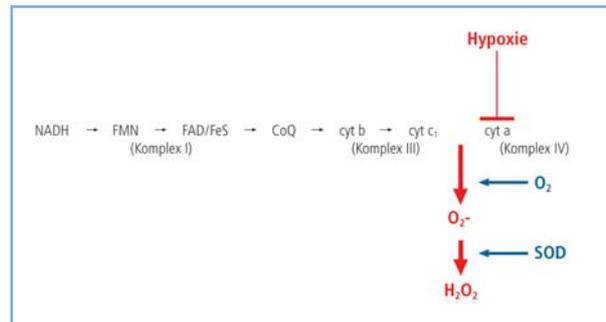


Abb. 7: Schema der Elektronenübertragung bei der Zellatmung. Sauerstoffmangel führt dazu, dass der Elektronentransport von Komplex III auf Komplex IV der Atmungskette unterbrochen ist. Die aufgelaufenen Elektronen werden auf Sauerstoff übertragen, was zur Bildung von Superoxid-Anionen führt.

Dieser Bildungsweg des Superoxids tritt in sehr vielen Zellen des Körpers auf. Das hierbei entstandene Superoxid dient der Stabilisierung eines bei Sauerstoffmangel gebildeten Schutzmoleküls (Hyperoxia-inducible Factor-1a), das die Sauerstoffaufnahme und -verteilung im Körper verbessert. U.a. ist dieses Molekül an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt.

3.5.2 Enzymatische Bildung von Superoxid-Anionen

Im Körper sind sechs verschiedene Oxidasen, die zur Bildung von Wasserstoffperoxid beitragen, nachgewiesen. In der Hornhaut und dem vorderen Auge wurden insgesamt sechs verschiedene Oxidasen nachgewiesen. Besonders intensiv erforscht ist die Wirkung der Xanthinoxidase. Das Enzym liegt in zwei Varianten vor, nämlich als Xanthindehydrogenase und als Xanthinoxidase. Die Xanthindehydrogenase katalysiert den Abbau von Purinen (Adenin, Guanin) über Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure. Harnsäure selbst ist ein sehr wirksames Antioxidantie.

Ebenso kritisch wie der Sauerstoffmangel selbst ist die Phase, wenn sich die Sauerstoffversorgung wieder normalisiert. In Phasen von Sauerstoffmangel wird die Xanthindehydrogenase durch Oxidierung von SH-Gruppen oder Proteolyse zur Xanthinoxidase umgewandelt. Die Xanthinoxidase hat als Substrat Hypoxanthin und als Reduktionsäquivalent Sauerstoff. Liegt wieder ausreichend Sauerstoff vor, so kann die nun vorliegende Xanthinoxidase entsprechend der folgenden Reaktion



die Entstehung von Superoxid-Anionen katalysieren.

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass lange währendes Tragen von Kontaktlinsen und die damit verbundene Hypoxie die Bildung von Xanthinoxidase begünstigen. Nach dem Absetzen der Kontaktlinse und der damit verbundenen Verbesserung der Sauerstoffversorgung der Hornhaut kam es zu einer gesteigerten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch eine gesteigerte Aktivität der Xanthinoxidase. Gleichzeitig war jedoch die Aktivität der Katalase, die das aus dem Superoxid-Anion gebildete Wasserstoffperoxid neutralisiert, deutlich verringert (Cejkova et al., 1998). Hierdurch bedingt kann es wiederum über die Fenton-Reaktion zu einer Anreicherung freier Hydroxyl-Radikale kommen.

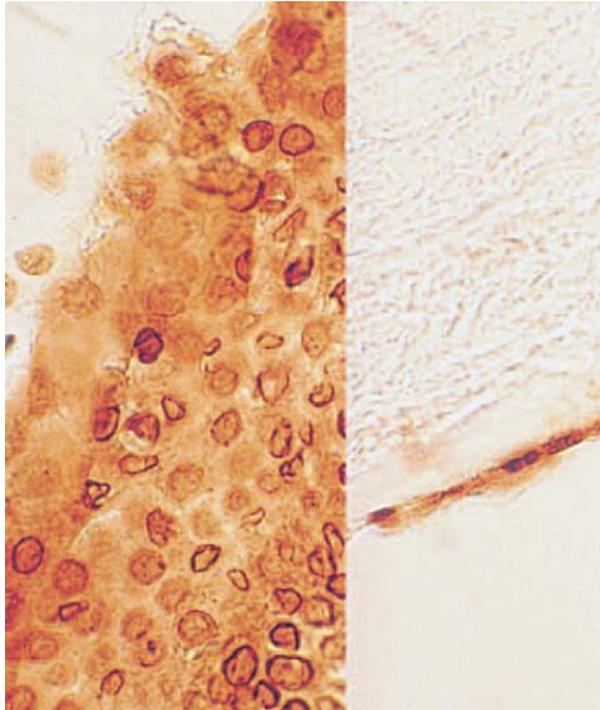
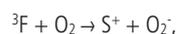


Abb. 8: Xanthinoxidase im Epithel (links) und Endothel (rechts) der Hornhaut. (mit freundlicher Genehmigung J. Cjekova)

PMN-Zellen, die beim Schlaf in den Tränenfilm einwandern und auch im Mittelpunkt von Abwehrreaktionen im Stroma der Hornhaut stehen, verfügen über Xanthinoxidasen mit hoher Aktivität. Ein großer Teil der bei bakteriellen Entzündungen der Hornhaut zu beobachtenden Gewebeschäden dürfte auf überschießende Reaktionen der PMN-Zellen und nicht die direkte Wirkung der Bakterien zurückzuführen sein.

3.6 Fluoreszein

Fluoreszein, das sogar intravenös verabreicht werden kann, gilt generell als harmlos. Dennoch kann es in seltenen Fällen zu toxischen Reaktionen Anlass geben. Hierbei handelt es sich in der Regel um foto-toxische Reaktionen. Fluoreszein geht nach der Absorption von optischer Strahlung in einen angeregten Zustand, den so genannten Triplett-Zustand über. Nun wird die Anregungsenergie vom Fluoreszein auf ein Sauerstoff-Molekül übertragen, das dadurch ebenfalls in einen angeregten Triplett-Zustand übergeht. Die Anregungsenergie des Fluoreszeins kann auch dazu benutzt werden, um ein Superoxid-Anion zu bilden.



wobei 3F der angeregte Zustand des Fluoreszein und S sein Grundzustand ist.

3.7 Kataraktoperationen

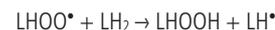
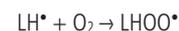
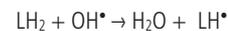
Freie Radikale spielen eine wichtige Rolle bei postoperativen Komplikationen nach Phakoemulsifikation im Rahmen von Kataraktoperation. Offensichtlich sind mechanische Verletzungen des Hornhautendothels durch den bei der Zertrümmerung der Augenlinse eingesetzten Ultraschall die Ursache für die Entstehung freier Radikale. Die Konzentration freier Radikale während der Phakoemulsifikation kann, wie

Versuche an Kaninchen zeigten, durch vorheriges Einfüllen von Hyaluronsäure in die Vorderkammer um bis zu 60 % reduziert werden. Auch die Zahl der verloren gegangenen Endothelzellen wird um rund 60 % vermindert (Camillieri et al, 2004).

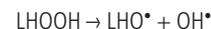
4. Lipidperoxidation

Die Peroxidation von Lipiden ist eine der wichtigsten Schädigungen, die von reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen werden kann. Es gibt eine Tendenz in der Fachliteratur, Lipidoxidation mit oxidativem Stress gleichzusetzen (Ivanova und Ivanov, 2000). Es ist das freie Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}), das Auslöser der Lipidperoxidation ist. Die Lipidperoxidation erfolgt in mehreren Schritten. Diese sind Initiation, Fragmentation, Propagation und Termination.

Besonders anfällig für die Lipidperoxidation sind Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, die über Kohlenstoffdoppelbindungen verfügen. Die Initiation beginnt mit der Entfernung eines Wasserstoffatoms von einem Lipid. Am Ende der Initiation steht die Bildung eines Lipidhydroperoxids (LHOOH). Die Schritte der Initiation sind

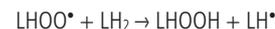
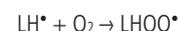
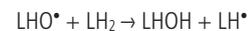
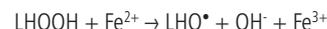


Hierbei ist LH_2 das Lipid, LH^{\cdot} ein Lipidradikal und LHO_2^{\cdot} ein Peroxyradikal. Das Lipidhydroperoxid zerfällt in kleinere Bestandteile.



LHO^{\cdot} stellt ein Alkoxy-Radikal dar. In dieser als Fragmentation der Lipide bezeichneten Phase der Lipidperoxidation entstehen u.a. Malondialdehyd, das als Indikatormolekül für die Lipidperoxidation gilt, und das äußerst aggressive 4-Hydroxy-2-Nonenal.

Die Lipidperoxidation ist durch die Fähigkeit zur Autokatalyse gekennzeichnet. Bei Anwesenheit von Metallionen können sich stetig neue Lipidhydroperoxide bilden. Hierdurch kann sich die Lipidperoxidation weiter ausbreiten (Propagation).



Die Folge von Autokatalyse und Propagation ist, dass auch geringfügige vorhandene Mengen an freien Hydroxyl-Radikalen zu großen Schäden führen können. Die Lipidperoxidation findet ein Ende (Termination), wenn freie Radikale eine feste Bindung eingehen oder Radikalfänger, die Reaktionen beenden.

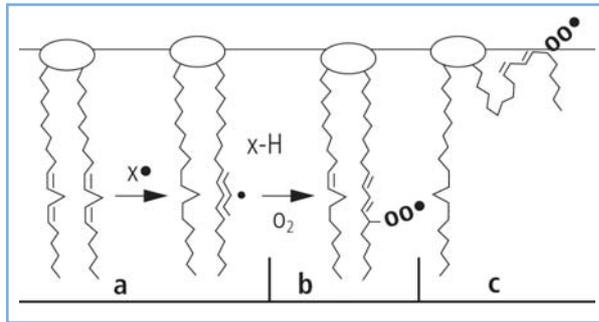


Abb. 9: Lipidperoxidation.

- a: *Initiation: Ein freies Radikal (X•) entfernt einen Wasserstoff von der freien Fettsäure des Lipids.*
- b: *Einbau von Sauerstoff in das Lipid. Es entsteht ein Peroxyl-Radikal*
- c: *Strukturveränderung des Lipids. Der hydrophile Teil des Moleküls verlagert sich an die Grenzfläche zum äußeren wässrigen Milieu. In einem nächsten Schritt zerfällt das Lipid*

5. Abwehrmechanismen

Die Hornhaut ist auf Grund ihres Absorptionsvermögens im Ultraviolett einem hohen Risiko ausgesetzt, durch UV-induzierte freie Radikale geschädigt zu werden. Daher verfügt sie über verschiedene Abwehrmechanismen, die sie vor der schädigenden Wirkung des UV und neu gebildeter freier Radikale schützen soll. Auch der Tränenfilm enthält zahlreiche Antioxidantien wie beispielsweise Harnsäure, Ascorbinsäure, Tyrosin oder Glutathion sowie die Superoxid-Dismutase (ZnCu-SOD).

Substanz	Tränenfilm	Blut
Vitamin A	16 ng/ml	883 ng/ml
Ascorbinsäure	117 µg/ml	7–20 µg/ml
Tyrosin	45 µM	77 µM
Glutathion	107 M	?
CuZn-SOD	103 ng/mg Protein	?

Tabelle 3: Antioxidantien im Tränenfilm (nach Tsubota, 2002)

5.1 Aldehyd-Dehydrogenase 3A1

ALDH3A1, ein Isoenzym der Aldehyd-Dehydrogenase macht bis 40 % der wasserlöslichen Proteine in der Hornhaut aus (Pappa et al., 2003). Dieses Enzym absorbiert direkt UV-Strahlung. Es ist darüber hinaus in der Lage cytotoxische Aldehyde, wie beispielsweise das durch Lipidperoxidation entstandene Malondialdehyd zu beseitigen. Weiterhin kann ALDH3A1 auch die durch 4-HNE induzierte Apoptose von Zellen des Endothels unterdrücken. 4-HNE (4-Hydroxy-2-Nonenal) ist das am weitesten verbreitete Aldehyd, das bei Lipidperoxidation entsteht. Es verfügt zudem über das größte toxische Potenzial.

Es konnte gezeigt werden, dass eine defekte Variante dieses Enzyms, bei der vier Aminosäuren ausgetauscht wurden, die Hornhaut besonders anfällig gegenüber UV-Schäden macht (Downes et al., 1993; Shiao et al., 1999; Pappa et al., 2001)

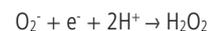
5.2 Superoxid-Dismutase

Die reaktive Sauerstoffspezies mit dem höchsten zellschädigenden Potenzial ist das freie Hydroxyl-Radikal (OH•), das am Anfang der Lipidperoxidation zum tragen kommt. Da diese Reaktionen enzymatisch

schwer zu kontrollieren sind, erfolgt die Kontrolle der OH•-Konzentration am ersten Schritt der Reaktionskette, die zur Bildung des freien Hydroxyl-Radikals steht. Dies ist die Bildung des Superoxid-Anions und seine Beseitigung durch die Superoxid-Dismutase.

Die Hornhaut verfügt über drei verschiedene Superoxid-Dismutasen, von denen zwei intrazellulär und eine extrazellulär vorkommt. Eine der intrazellulären Superoxid-Dismutase enthält Kupfer und Zink. Sie ist aus 302 Aminosäuren aufgebaut und besteht aus zwei gleichen Unter-einheiten mit einem Molekulargewicht von je 16 kDa. Eine Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase findet man in den Mitochondrien der Hornhautzellen. Völlig anders als die beiden intrazellulären Superoxid-Dismutasen ist die extrazelluläre Superoxid-Dismutase. Mit einem Molekulargewicht von 138.000 Da ist sie mehr als viermal so groß wie die intrazellulären Superoxid-Dismutasen. Die extrazelluläre Superoxid-Dismutase hat eine hohe Affinität zu Kohlenhydraten. Man findet sie daher häufig gebunden an Proteoglykanen im Bindegewebe, auf Basalmembranen und auf Zelloberflächen.

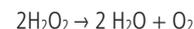
Die Aufgabe der Superoxid-Dismutase besteht in der Dismutation von Superoxid-Anionen. Bei dieser Reaktion wird das Superoxid-Anion unter Aufnahme eines weiteren Elektrons entsprechend des folgenden Reaktionsschemas



zu Wasserstoffperoxid oxidiert. Das neu entstandene Wasserstoffperoxid, das aber weniger reaktionsfreudig ist, als das Superoxid-Anion, muss unter Einsatz von Katalasen zu Wasser abgebaut werden.

5.3 Katalasen

Katalasen sind weit verbreitete Enzyme, die Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff zerlegen.



Sie zählen zu den schnellsten Enzymen der Natur. Gegenüber einer nichtkatalysierten Reaktion steigert Katalase den Abbau von Wasserstoffperoxid um das mehr als Milliardenfache. Pro Sekunde vermag ein einziges Katalase-Molekül rund 108 Wasserstoffperoxid-Moleküle zu zersetzen. Die im Hornhautepithel vorhandene Katalase vermag Wasserstoffperoxid-Konzentrationen von bis zu 50 ppm zu beseitigen. Im Stroma hingegen sind keine Katalasen nachgewiesen worden. Die Katalase kann durch äußere Faktoren wie beispielsweise das im Tabakrauch enthaltene Cyanid gehemmt werden.

5.4 Glutathion (Glutathion-SH, GSH)

Glutathion ist ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutamin, Cystein und Glycin. Es kann durch eine reversible Oxidation in das Disulfid GSSG übergehen. Peroxide und freie Radikale werden durch die Selenhaltige Glutathionperoxidase, deren Co-Faktor GSH ist, reduziert. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser. Bei dieser Reaktion wird GSH in die oxidierte Form GSSG überführt. Das oxidierte GSSG wird durch das Enzym Glutathionreduktase wieder in die reduzierte Form GSH überführt.

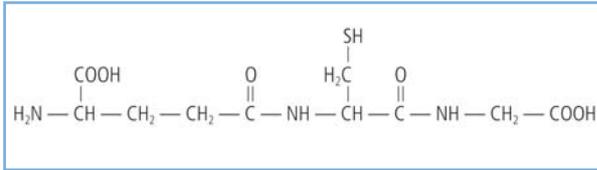


Abb. 10: Glutathion. Die SH-Gruppe des Moleküls kann mit der SH-Gruppe eines anderen Glutathion-Moleküls eine Schwefel-Doppelbindung eingehen. Es entsteht dann GSSG.



Abb. 11: Erneuerung des GSH aus GSSG. Beim Übergang von GSH zu GSSG wird Wasserstoffperoxid zu Wasser umgebaut.



Abb. 12: Endothelzellen des Hornhautepithels nach Oxidierung des Glutathions. Glutathion ist für die Funktionsfähigkeit des Hornhautendothels von großer Bedeutung, da es die Wasserpumpen des Endothels vor den schädigenden Einflüssen freier Radikale schützt.

Glutathion liegt sowohl im Kammerwasser als auch dem Endothel und Epithel der Hornhaut vor. Auch im Tränenfilm wurde Glutathion nachgewiesen. Das Verhältnis von reduziertem und oxidiertem Glutathion scheint für die Funktionsfähigkeit des Hornhautendothels von großer Bedeutung sein. Eine experimentelle Oxidation von Glutathion durch Diamide führt zu einem Zusammenbruch der Barrierenfunktion des Endothels (siehe Abb. 12). Offensichtlich schützt Glutathion das Endothel vor freien Radikalen und unterstützt dadurch sowohl die Pump- als auch Barrierenfunktion des Endothels (Edelhauser und Ubels, 2003). In Spüllösungen (Glutathion-Bicarbonat-Ringer's Solution GBR) für intraokuläre Eingriffe wird Glutathion in Konzentrationen von 0,3 mmol/l eingesetzt. Dies entspricht dem 150fachen der Konzentration von Glutathion im Kammerwasser. Selbst eine nur 30-minütige

Spülung des Endothels mit einer Glutathionfreien Lösung führt zu einem Polymegathismus und Polymorphismus der Endothelzellen (Edelhauser und Ubels, 2003).

5.5 Ascorbinsäure

Ascorbinsäure oder Vitamin C ist ein wasserlösliches Vitamin, das besonders im wässrigen Milieu als Schutzmolekül eine große Rolle spielt. Im Auge liegt es in Konzentrationen vor, die die des Blutes um ein Vielfaches übersteigen. Im Tränenfilm tragen Ascorbinsäure und Harnsäure zu mehr als 50% zur antioxidativen Wirkung des Tränenfilms bei. (Eine weitere wichtige Antioxidantie des Tränenfilms ist die Aminosäure Tyrosin.) Vermutlich stammt die Ascorbinsäure des Tränenfilms aus der Tränendrüse.

Die Hornhaut enthält große Mengen an Ascorbinsäure. Die höchste Ascorbinsäure-Konzentration liegt hier mit 1,56 mg/g im zentralen Hornhautepithel vor (Cejkova et al., 2004). In der Peripherie sind es immer noch 1,39 mg/g. Hornhautstroma und Descemet'sche Membran weisen mit 0,22 mg/g einen nahezu gleich hohen Gehalt an Ascorbinsäure auf wie das Kammerwasser (0,21 mg/g). Sklera und Bindehaut haben wesentlich niedrigere Ascorbinsäure-Konzentrationen. Dass das zentrale Hornhautepithel im Bereich der Pupillenöffnung die höchste Konzentration an Ascorbinsäure aufweist, deutet auf eine besondere Schutzfunktion der Ascorbinsäure hin. Es dient hier als UV-Filter, das die tieferen Hornhautschichten schützen soll.

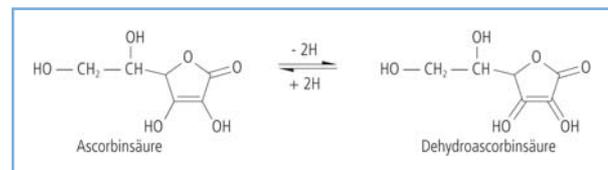


Abb. 13: Ascorbinsäure

Neben seiner Funktion als UV-Filter wirkt Ascorbinsäure auch als antioxidative Substanz. Es kann durch Aufnahme bzw. Abgabe von Protonen zwischen dem reduzierten Zustand (Ascorbinsäure) und oxidierten Zustand (Dehydroascorbinsäure) wechseln. In hohen Konzentrationen kann Ascorbinsäure, wenn Metallionen vorliegen, als Prooxidant auftreten. Es begünstigt die Entstehung von Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikalen und anderer reaktiver Radikale.

5.6 Eisenbindende Proteine

Eisen spielt eine nicht unerhebliche Rolle bei der Bildung äußerst reaktiver freier Hydroxyl-Radikale. Im Tränenfilm sind erhebliche Mengen an Laktoterrin enthalten. Laktoterrin ist ein eisenbindendes Protein. Hierdurch wird im Tränenfilm die Vermehrung von Bakterien, die für die Neusynthese ihrer DNA auf Eisen angewiesen sind, erschwert. Zugleich wird aber auch die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu einem freien Hydroxyl-Radikal (Fenton-Reaktion) eingeschränkt.

6. Erkrankungen der Hornhaut und freie Radikale

Dass freie Radikale an zahlreichen Erkrankungen maßgeblich beteiligt sind, ist schon lange bekannt. Es mehren sich nun aber auch die Hinweise, dass freie Radikale bei einigen pathologischen Veränderungen der Hornhaut mitbeteiligt sind. Besonders für den Keratoconus gibt es konkrete Befunde, die auf einen Einfluss von freien Radikalen hindeuten.

6.1 Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien

Die Hornhaut ist allein auf Grund physiologischer Vorgänge bei der Energiegewinnung ständigen Attacken durch reaktive Sauerstoffspezies und aggressiven freien Radikalen wie Peroxynitrit ausgesetzt. Die intakte Hornhaut verfügt über ausreichende Abwehrmöglichkeiten (Superoxid-Dismutase, GSH), die die Entstehung von freien Radikalen aus Prooxidantien verhindern und bereits entstandene freie Radikale wieder beseitigen können. Neu gebildete reaktive Moleküle werden sofort wieder in den Zellen beseitigt. Bei oxidativem Stress jedoch, wie beispielsweise während und nach Hypoxie, Entzündungen, erhöhter Stoffwechselrate aber auch UVB oder Ozon, kann die Bildungsrate der reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien die antioxidativen Kapazitäten der Zelle überschreiten. Auch die Kontaktlinse kann zu Stresssituationen der Hornhaut führen, die die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies fördern. Die vermehrt gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies, die durch antioxidative Schutzmechanismen nicht beseitigt werden konnten, verlassen die Zelle. Sie leiten die Lipidperoxidation und damit den Untergang der Zelle ein.

6.2 Keratoconus

Der Keratoconus ist durch eine starke Verdünnung des Hornhautstromas gekennzeichnet. Die Hornhaut ist beim Keratoconus durch eine verminderte Zahl von Keratozyten und Kollagenlamellen im Stroma gekennzeichnet. Die Mechanismen, die zu der Verdünnung des Hornhautstromas führen, sind gesteigerte Aktivitäten verschiedener Proteasen, eine Hemmung der Protease-Inhibitoren, vermehrte oxidative Schäden sowie die Apoptose von Zellen der Hornhaut.



Abb. 14: Keratoconus. Beim Keratoconus konnten erhöhte Konzentrationen von Malondialdehyd und 3-Nitrotyrosin nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung von freien Radikalen auf die Entstehung des Keratoconus hin.

Beim Keratoconus wurde im Stroma eine im Vergleich zu unauffälligen Hornhäuten um 50 % verminderte Konzentration an extrazellulärer Superoxid-Dismutase gefunden. (Behndig et al., 2001). Die Zellen des Epithels und Stromas bilden offensichtlich beim Keratoconus weniger dieses wichtigen Schutzmoleküls. Auch nach Keratoconusbedingten Hornhauttransplantationen wurde weniger extrazelluläre Superoxid-Dismutase nachgewiesen. Offensichtlich werden die Zellen des Transplantats im Laufe der Zeit durch eingewanderte Zellen vom Limbus ersetzt, die nicht über die Fähigkeit zur Synthese der Superoxid-Dismutase verfügen.

Eine gesunde Hornhaut ist stetigen Attacken durch freie Radikale und reaktiven Sauerstoffspezies, die über die Bildung von Peroxynitrit zu nachweisbaren Gewebeschäden führen, ausgesetzt. Die Hornhaut verfügt aber über ausreichende Kapazitäten, um die Entstehung von Peroxynitrit zu verhindern. Beim Keratoconus hingegen scheint die Hornhaut ihre Fähigkeit zur Vermeidung der Bildung von Peroxynitrit verloren zu haben.

Die Hornhaut verfügt beim Keratoconus über eine vermehrte Ausstattung mit NO-Synthasen. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wurde im Bereiche der Risse der Bowmanschen Membran nachgewiesen. Bei gesunden Hornhäuten hingegen konnte keine iNOS nachgewiesen werden (Buddi et al., 2002). Dauerhaft aktive NO-Synthase (NOS-I oder NOS-III) wurde in allen Hornhäuten im Bereich des Epithels und Endothels nachgewiesen.

Da das Superoxid-Anion leicht mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagieren kann, sollten beim Keratoconus auch erhöhte Peroxynitrit-Werte nachweisbar sein. Beim Keratoconus konnten speziell in den Bereichen der Bowmanschen Membran, in denen es zur Rissbildung kam, erhöhte 3-Nitrotyrosin-Werte festgestellt werden (Buddi et al., 2002). 3-Nitrotyrosin gilt wie gesehen als Indikatormolekül für die Anwesenheit von Peroxynitrit. Auch im Epithel konnte durchgängig 3-Nitrotyrosin nachgewiesen werden.

Nachdem offensichtlich besonders ein erhöhter Gehalt an Peroxynitrit an der Entstehung des Keratoconus nicht unerheblich beteiligt ist, stellt sich die Frage, wie das Peroxynitrit an der Verdünnung der Hornhaut mitwirkt. In der Hornhaut sind Matrix-Metalloproteasen (MMP) vorhanden. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die in der Lage sind, Moleküle der extrazellulären Matrix abzubauen. U.a. werden auch Kollagenasen und Gelatinasen zu den Matrix-Metalloproteasen gezählt. Damit es zu keinen unkontrollierten Schädigungen des Gewebes kommt, müssen die MMP durch entsprechende hemmende Inhibitoren gehemmt werden. In der Hornhaut ist dies TIMP (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease). TIMP-1 kann zudem die Apoptose von Keratozyten unterdrücken. Beim Keratoconus wurden höhere Konzentration der Matrix-Metalloprotease MMP2, einer Gelatinase, gefunden (Wong et al., 2002) Brown et al. fanden, dass beim Keratoconus Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit die Aktivität von TIMP-1 hemmen und dadurch die Aktivität von MMP2 steigern. (Brown et al., 2004). Sie folgern daher, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen oxidativem Stress der Hornhaut und einer Verdünnung des Stromas.



Abb. 15: Matrix-Metalloprotease MMP2, deren Aktivität im Hornhautstroma beim Keratoconus erhöht ist.

Neben erhöhten 3-Nitrotyrosin-Werten lässt sich beim Keratoconus auch Malondialdehyd nachweisen. Dieses Produkt der Lipidperoxidation der Zellmembranen ließ sich besonders im Bereich der Risse in der Bowmanschen Membran nachweisen (Buddi et al., 2002). Die Aldehyde hemmen u.a. die Synthese von RNA, DNA und Proteinen.

6.3 Sonstige Hornhauterkrankungen

Neben dem Keratokonus gilt eine Beteiligung freier Radikale auch bei der bullösen Keratopathie und der Fuchsschen Endotheldystrophie als sehr wahrscheinlich. Eine bullöse Keratopathie ist durch ein Anschwellen der Hornhaut mit schmerzhaften Flüssigkeitseinlagerungen im Hornhautepithel, den so genannten Bullae gekennzeichnet. Sie ist die Folge einer exzessiven Quellung der Hornhaut. Bei der bullösen Keratopathie wurde in fibrösen Bereichen des vorderen und hinteren Stromas Malondialdehyd, das auf eine Lipidperoxidation zurückzuführen ist, nachgewiesen (Buddi et al., 2002). Diese korrelieren mit erniedrigten Mengen an Superoxid-Dismutase. Obgleich iNOS gefunden wurde, war 3-Nitrotyrosin nicht nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass trotz bestehender pathologischer Veränderung der Hornhaut noch ausreichende Schutzmechanismen vorhanden sind, die die Anreicherung von Peroxynitrit verhindern.

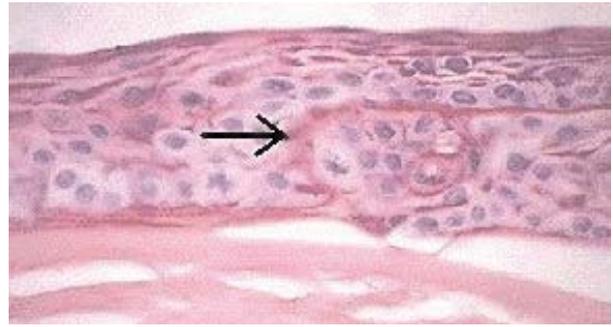


Abb. 16: Bullöse Keratopathie: Der Pfeil weist auf eine intraepitheliale Basalmembran hin. Ein ähnliches Erscheinungsbild kann auch bei der Fingerprint- bzw. Map-Dot-Dystrophie beobachtet werden.

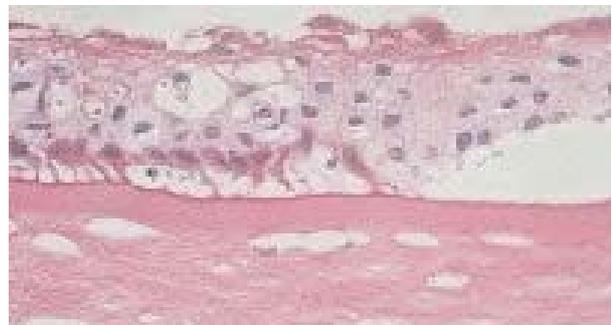


Abb. 17: Bullöse Keratopathie: Im Epithel sind zahlreiche Zysten zu erkennen. Die Hohlräume im Stroma sind Präparationsartefakte.

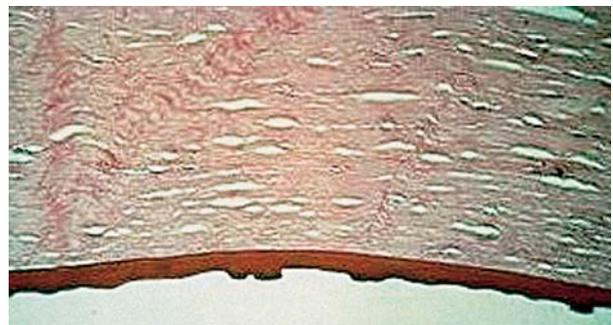


Abb. 18: Fuchssche Endotheldystrophie. Zu erkennen ist der Verlust des Hornhautendothels.

Die Fuchssche Endotheldystrophie tritt 3 und 4. Lebensjahrzehnt erstmalig in Erscheinung und schreitet dann kontinuierlich fort. Im Bereich der Descemetischen Membran kommt es zu Verdickungen (Guttatae). Die Endothelzellen sind bezüglich Größe und Gestalt verändert. Ein Zusammenbruch des Endothels führt zu Ödemen von Stroma und Epithel. Häufig ist eine Keratoplastik zusammen mit einer extrakapsulärer Linsenextraktion erforderlich. Wie bei der bullösen Keratopathie lag auch bei der Fuchsschen Endotheldystrophie iNOS in der Hornhaut vor. In diesem Fall ging die Anwesenheit von iNOS aber mit der Anreicherung von 3-Nitrotyrosin einher. Malondialdehyd wurde ebenfalls gefunden.

Zusammenfassung:

Die Hornhaut ist stetigen Belastungen durch freie Radikale, wobei in erster Linie freie Sauerstoffspezies und das unter Beteiligung von Super-

oxid gebildete Peroxynitrit von Bedeutung sind. Unter normalen Bedingungen besteht eine ausgewogene Balance zwischen Prooxidantien und Antioxidantien bzw. Schutzfaktoren. Durch Umwelteinflüsse (UV, Ozon, Luftverschmutzung, Kontaktlinsen) oder endogene Faktoren (Entzündungen, Infektionen, erhöhte Stoffwechselaktivität, Hypoxie) kann das Verhältnis zu Ungunsten der Schutzfaktoren verschoben sein. Es bleibt zu diskutieren, ob und gegebenenfalls wie eine Zufuhr von Antioxidantien die Situation für die Hornhaut verbessern kann.

Literatur:

Behndig A, Karlsson K, Johansson BO, Brännström T, Marklund SL: Superoxid Dismutase Isoenzymes in the Normal and Diseased Human Cornea, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2293–2296

Brown DJ, Lin B, Chwa M, Atilano SR, Kim DW, Kenney MC: Elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity, *Mol Vis* 2004; 10: 281–288

Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ: Evidence of Oxidative Stress in Human Corneal Diseases, *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 341–351

Camillieri G, Nastasi A, Gulino P, Bucolo C, Drago F: Effects of Hyaluronan on the Free-Radical Formation, Corneal Endothelium Damage, and Inflammation Parameters After Phacoemulsification in Rabbits, *J Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2004; 20: 151–157

Cejkova J, Labsky J, Vacik J: Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Xanthine Oxidase in the Corneal Epithelium and their Potential Participation in the Damage of the Corneal Epithelium after Prolonged Use of Contact Lenses in Rabbits, *Acta Histochem* 1998; 100: 171–184

Cejkova J, Stipek S, Crkovska J, Ardan T, Platenik J, Cejka, Midelfahrt A: UV Rays, the Prooxidant/Antioxidant Imbalance in the Cornea and Oxidative Eye Damage, *Physiol Res* 2004; 53: 1–10

Dighiero P, Behar-Cohen F, Courtois Y, Goureau O: Expression of inducible nitric oxide synthase in bovine corneal endothelial cells and keratocytes in vitro after lipopolysaccharide and cytokines stimulation, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2045–2052

Ding C, Walcott B, Keyser KT: Neuronal nitric oxide synthase is expressed in the mouse lacrimal gland and neurons of pterygopalatine ganglion, in *Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndrome 3*, ed. D Sullivan et al., Kluwer Academic/Plenum Publisher New York 2002: 91–95

Downes JE, Swann PG, Homes RS: Ultraviolet light-induced pathology in the eye associated changes in ocular aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities, *Cornea* 12: 241–248

Edelhauser HF, Ubels JL: Cornea and Sclera, in Kaufman PL, Alm A. ed. *Adler's Physiology of the Eye*, Mosby, St. Louis 2003: 45–114

Ivanova E, Ivanov B: Mechanisms of the extracellular antioxidant defend, *Bulgarian Academy of Sciences: Experimental Pathology and Parasitology* 4/2000: 49–57

Kim JC, Cheong TB, Park, GS, Park MH, Kwon NS: The role of nitric oxide in ocular surface diseases, in *Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndrome 3*, ed. D Sullivan et al., Kluwer Academic/Plenum Publisher New York 2002: 687–695

Pappa A, Sophos NA, Vasiliou V: Corneal and stomach expression of aldehyde dehydrogenase from fish to mammals, *Chem Biol Interact* 2001; 130: 181–191

Shiao T, Tran P, Siegel D, Lee J, Vasiliou V: Four amino acid changes are associated with ALDH3A1 locus polymorphism in mice which may be responsible for corneal sensitivity to ultraviolet light, *Pharmacogenetics* 1999; 9: 145–153

Tsubota K: Understanding dry eye syndrome, in *Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndrome 3*, ed. D Sullivan et al., Kluwer Academic/Plenum Publisher New York 2002: 5–16

Wong TTL, Sethi S, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT: Matrix Metalloproteinases in Disease and Repair Processes in the Anterior Segment, *Surv Ophthalmol* 2002; 47: 239–256



contopharma[®]

Von allen Contactlinsen-Systemen hat die Tageslinse am wenigsten die Gelegenheit, sich in den physiologischen Bestandteilen des Tränenfilms zu equilibrieren.

Die Lösung «daily soft» entspricht in ihren Grundbestandteilen der neuartigen Produktfamilie der CONTOPHARMA Comfort-Lösung. Darüber hinaus enthält sie spezielle Komponenten zur Neutralisierung von freien Sauerstoffradikalen.

Die Lösung ist empfohlen für das Spülen und Konditionieren der Tageslinsen vor dem Aufsetzen oder direkt am Auge.



CONTOPHARMA AG

Bahnhofstrasse 5a, 3800 Interlaken
Tel. +41 (0)33 827 90 00, Fax +41 (0)33 827 90 09
www.contopharma.ch, info@contopharma.ch