

Grauer Star und oxidativer Streß

Neues Diagnoseverfahren beim Grauen Star

Von W. Lohmann, W. Schmehl und J. Strobel

Eine große Anzahl an Menschen leidet besonders in fortgeschrittenem Alter an einer Katarakt (Grauer Star), eine Krankheit, die zu einer starken Beeinträchtigung der Sehfähigkeit oder gar zu Blindheit führen kann. Die meist verbreitete Form der Alterskatarakte ist die nukleäre Katarakt (Cataracta nuclearis), bei welcher der zentrale Bereich der Augenlinse allmählich an Dichte zunimmt und eintrübt, sowie von einer von gelb nach dunkelbraun fortschreitenden Färbung befallen wird. Als Ursache für die Eintrübung der Linse wird die Bildung hochmolekularer Proteinaggregate angesehen, während photochemisch entstehende Chromophore für die Färbung verantwortlich zu sein scheinen. Trotz intensiver Forschung sind bis heute weder die chemische Natur dieser Chromophore noch die zur Kataraktbildung führenden molekularen Mechanismen bekannt.

Neben anderen Ursachen werden Diabetes mellitus, Nierenversagen, Bestrahlung durch ultraviolettes Licht und andere Strahlenarten sowie Galactoseunverträglichkeit und viele Medikamente als Risikofaktoren der Kataraktentstehung angesehen. Doch weder der erste Reaktionsschritt noch die Kette der weiteren, zur Ausbildung einer Katarakt führenden Prozesse sind bekannt. Neuere Untersuchungen zeigen, daß kataraktfördernde Agentien mit den Aminogruppen von Proteinen reagieren und stabile, kovalente Verbindungen eingehen können. Diese Verbindungen bewirken in den Proteinen eine zunehmende Rate an Oxidationen von Sulfhydrylgruppen und dadurch die Bildung hochmolekularer Proteinaggregate.

Es sollte betont werden, daß in menschlichen Alterskatarakten üblicherweise andere Vernetzungen von Proteinen als die gefundenen Disulfidbrücken beobachtet werden. Um den vielen Menschen, die an verminderter Sehfähigkeit leiden, helfen zu können, ist es von größter Bedeutung, die molekularen Mechanismen der Kataraktbildung aufzuklären. Nur wenn wir die normalerweise in der Linse ablaufenden Stoffwechselprozesse und deren Modifikationen im Falle einer Katarakterkrankung verstehen, wird es möglich sein, erfolgreiche Methoden zur Vorsorge oder Behandlung der menschlichen Katarakte zu entwickeln.

Zur Zeit gibt es eine Reihe von Hinweisen auf einen großen Einfluß von Oxidationsprozessen auf die Bildung einer Katarakt, die zu einer Veränderung des Redoxpotentials (Redox \cong Reduktion-Oxidation) in der Augenlinse führen. Wie allgemein bekannt, ist Ascorbinsäure (Vitamin C) ein sehr wichtiges Redoxsystem der Augenlinse. Eine Modifikation dieses Systems wird natürlich die anderen Redoxsysteme, mit denen es gekoppelt ist, nämlich z. B. Glutathion, NADH/NAD⁺ (reduzierte und oxidierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotids), NADPH/NADP⁺ (reduzierte und

oxidierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphats), beeinflussen und umgekehrt. Weiterhin ist die Aktivität der für die Aufrechterhaltung der optimalen Bedingungen für eine einwandfreie Funktion notwendigen Enzyme von enormer Bedeutung. In diesem Zusammenhang ist das Enzym Catalase, welches die Konzentration von Wasserstoffsuperoxid (H₂O₂) reguliert, besonders wichtig.

H₂O₂ wird während der Oxidation der Ascorbinsäure gebildet und kann, wenn es nicht abgebaut wird, oxidative Schäden an Membranen und Proteinen verursachen, so zum Beispiel das Verhindern der Na⁺/K⁺-ATPase.

Weitaus bedeutsamer ist, daß H₂O₂, einmal durch Oxidation von Vitamin C produziert, weitere Ascorbinsäuremoleküle oxidieren kann, so daß eine Kettenreaktion in einer Art „Bioreaktor“ ablaufen kann. Um diesen „Reaktor“ physiologisch optimal funktionieren zu lassen, benutzt das Zellsystem Catalase als „Bremsselement“. Das Redoxsystem der Ascorbinsäure scheint somit eine zentrale Rolle im Metabolismus der Linse zu spielen.

Vitamin C ist in biologischen Systemen hauptsächlich (zu etwa 90–95%) in seiner reduzierten Form (ASC, Ascorbinsäure) vorhanden. Im Verlauf der Kataraktentstehung wird sie zu ihren oxidativen Abbauprodukten oxidiert, wobei ein vorübergehender Anstieg und eine darauf folgende Abnahme der semi-oxidierten Form (Ascorbylradikal, SDA) und der vollständig oxidierten Form (Dehydroascorbinsäure, DHA), zu verzeichnen ist. (s. Abb. 1). Da die oxidativen Abbauprodukte (Diketogolonsäure bis hin zu Methylglyoxal) nicht mehr als Ascorbinsäure bezeichnet werden können, nimmt während der Ausbildung einer Katarakt die totale Konzentration an Vitamin C in der Linse ab. Dies wird durch die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse verdeutlicht. Es wurden insgesamt 451 Linsen, darunter 5 Kontrolllinsen sowie 86, 354 beziehungsweise 6 Linsen der anderen aufgeführten Patientenkollektive, untersucht.

Vor kurzem untersuchten wir eine extrem dunkle Linse von einem Patienten mit sehr weit fortgeschrittener Katarakt. Die zugehörigen Vitamin-C-Werte sind in der letzten Spalte aufgeführt. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, nimmt die totale Ascorbinsäurekonzentration (ASC_{tot}) mit fortschreitender Katarakt ab, während der DHA-Anteil beträchtlich zunimmt (im Falle der dunklen Linse bis auf 68%). Somit ist die Abnahme der Vitamin-C-Konzentration nicht auf eine verminderte Versorgung, sondern eher auf eine beschleunigte Oxidationsrate zurückzuführen. Zum Vergleich sind in Tabelle 1 noch die intrazellulären Konzentrationen an Na, K, Ca und Mg aufgeführt.

Da das Ascorbylradikal das erste Oxidationsprodukt der Ascorbinsäure ist, sollte es möglich sein, diese vorübergehend auftretende Spezies mit Hilfe von Elektronenspin-Resonanz(ESR)-Messungen während der Kataraktentstehung zu verfolgen. Die von Linsen verschiedener Krankheitsstadien aufgenommenen Spektren sind in Abb. 2 gezeigt. Wie man sieht, zeigt eine junge gesunde Linse (control) nur ein sehr kleines Signal. Während eines frühen Krankheitsstadiums (Cataracta nuclearis incipiens) kann ein Signal bei g=2,005 aufgenommen werden, das wir dem Ascorbylradikal zuordnen konnten. Wie erwartet, verschwindet dieses Signal mit dem Fortschreiten der Krankheit. In einem sehr späten Stadium (Cataracta hypermatura) kann ein weiteres Signal mit erhöhter Spinkonzentration beobachtet werden, das bis jetzt noch nicht

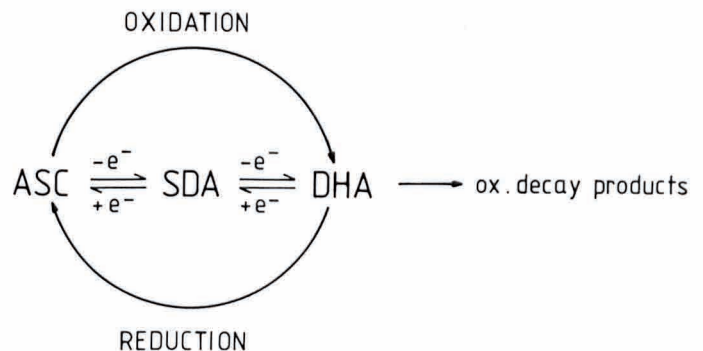


Abb. 1. Das Vitamin C-Redox-System. ASC = Ascorbinsäure (reduzierte Form), SDA = Semidehydroascorbinsäure (Ascorbyl-Radikal), DHA = Dehydroascorbinsäure (oxidierte Form). ox. decay products = oxidierte Zerfallsprodukte des Vitamin C.

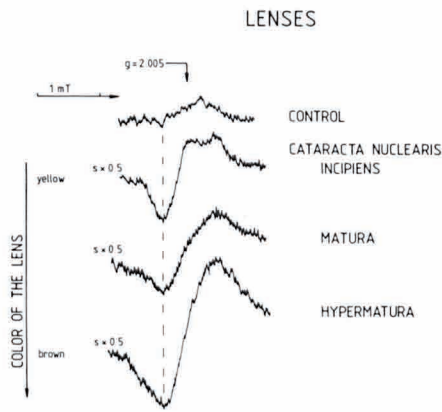


Abb. 2. Elektronenspin-Resonanz (ESR)-Spektren lyophilisierter menschlicher Linsen mit verschiedenen Stufen der Cataracta nuclearis. Die Kontrolllinse wurde von einem 21-jährigen Mann erhalten, bei dem die klare Linse aus refraktiven Gründen extrahiert wurde.

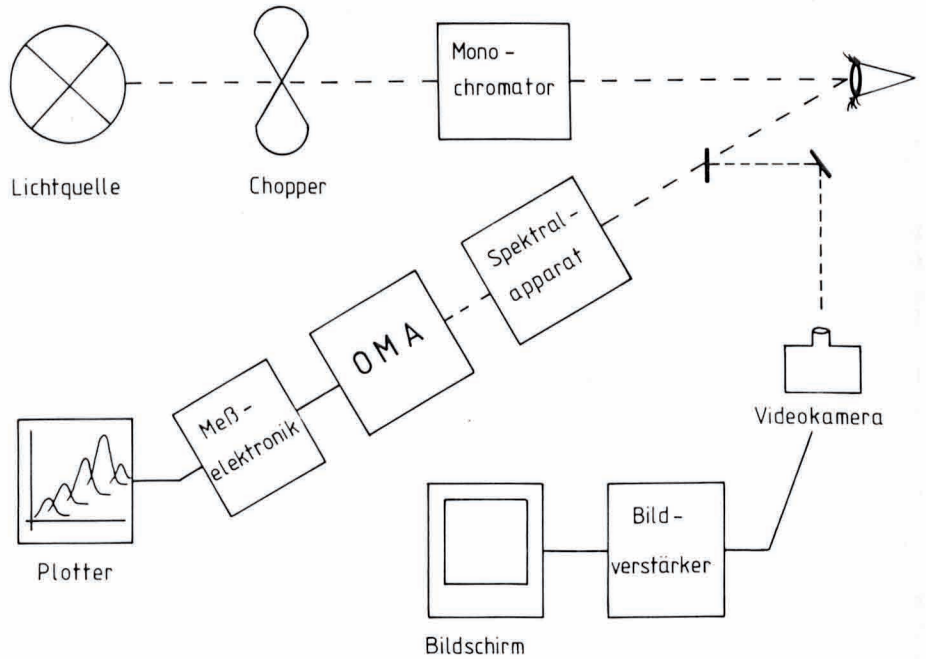


Abb. 4. Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers zur in-vivo-Messung.

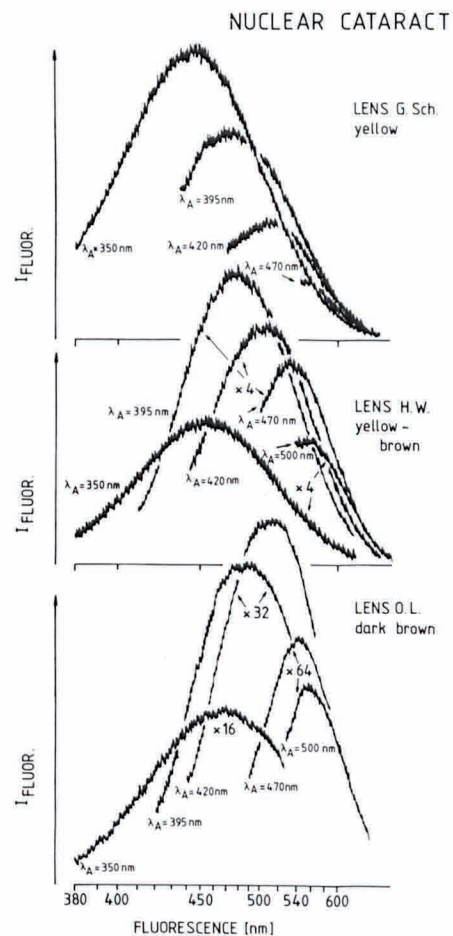


Abb. 3. Fluoreszenzspektren dreier verschieden gefärbter Linsen nach Anregung bei 350, 395, 420, 470 und 500 nm. Zum Vergleich der Intensitäten der Spektren müssen diese mit den angegebenen Faktoren multipliziert werden.

identifiziert werden konnte. Es scheint zu einem radikalischen Zustand eines der Oxidationsprodukte hinter der DHA, die selbst nicht paramagnetisch ist, zu gehören. Kürzlich konnten wir zeigen, daß Linsen von an Katarakt erkrankten Patienten einen typischen Satz von Fluoreszenzspektren zwischen 380 und 600 nm aufweisen, wenn sie monochromatisch bei 350, 395, 420, 470 oder 500 nm angeregt werden. Diese Spektren können dazu benutzt werden, den aktuellen Status der Krankheit quantitativ zu beschreiben (s. Abb. 3). Zu Beginn der Erkrankung rufen nur die kürzeren Anregungswellenlängen ein Fluoreszenzspektrum hervor (s. Linse des Patienten G. Sch.), wobei die Intensitäten mit zunehmender Wellenlänge der Anregung stark abnehmen.

Anstieg der Intensität

Mit Fortschreiten der Krankheit (und damit der Färbung der Linse) steigt die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei längerwelliger Anregung an (Linsen der Patienten H.W. und O.L.). Da ein stetiger Übergang zwischen diesen Mustern existiert, kann jede Stufe der Karatakt durch ein typisches Verhältnis der Fluoreszenzbanden charakterisiert werden. Es muß betont werden, daß eine gesunde Linse nur nach einer Anregung bei 350 nm eine geringe Fluoreszenzintensität aufweist.

Während der Autoxidation von Vitamin C-Lösungen ändert sich deren Farbe von durchsichtig bis hin zu dunkelbraun. Diese Farbänderungen sind den während der Kataraktogenese auftretenden Färbungen der Linsen sehr ähnlich. Die Fluoreszenzspektren dieser „alternden“, d.h. gefärbten, Ascorbinsäurelösungen sind mit den Spektren

erkrankter Linsen identisch, wenn die entsprechenden Wellenlängen zur Anregung benutzt werden. Eine frisch angesetzte Vitamin C-Lösung ist völlig durchsichtig und zeigt keinerlei Fluoreszenz.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse deuten stark darauf hin, daß die in Linsen von an Katarakt erkrankten Patienten vorkommenden Chromophore mit Ascorbinsäure in ihren verschiedenen Oxidationsstufen, die bestimmte Farben aufweisen und noch identifiziert werden müssen, identisch sein können. Da andere Redoxsysteme mit dem System der Ascorbinsäure gekoppelt sind, können Modifikationen dieser Systeme Änderungen im Vitamin C-Redoxsystem entweder hervorrufen oder aber die Folge davon sein. Die Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, daß Katarakt durch einen oxidativen Prozeß hervorgerufen wird, wobei die dafür verantwortliche Substanz noch identifiziert werden muß.

Prototyp entwickelt

Da die Fluoreszenztechnik sehr empfindlich ist, erlaubt sie die Feststellung physiologischer Veränderungen bereits in einem sehr frühen Stadium der Kataraktentwicklung und könnte als eine Methode zur Beobachtung von Therapieverläufen eingesetzt werden.

Der Prototyp eines Gerätes für die klinische Anwendung der Ergebnisse unserer Grundlagenforschung wurde am Institut für Biophysik der Universität Gießen entwickelt. Der prinzipielle Aufbau dieses Spektrometers ist in Abb. 4 dargestellt.

Der von einer Quecksilber-Hochdrucklampe als Lichtquelle ausgehende Lichtstrahl wird zunächst durch einen Chopper moduliert, was in Kombination mit einer speziell



Abb. 5: Gesamtübersicht über das Fluoreszenzspektrometer.

abgestimmten Meßelektronik für eine erhebliche Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses und damit für eine Verbesserung der Meßempfindlichkeit sorgt. Anschließend können mit Hilfe eines Gittermonochromators die oben bereits erwähnten Anregungswellenlängen eingestellt werden.

Strahlenbelastung gering

Das auf diese Weise gewonnene schmalbandige monochromatische Licht fällt nun auf die Linse und ruft dort die für den physiologisch typischen Zustand charakteristische Fluoreszenz hervor.

Das Fluoreszenzlicht wird in einem Gitterspektralapparat zerlegt und mittels eines optischen Vielkanalanalysators (optical multichannel analyser, "OMA") detektiert, verstärkt und die so erhaltenen Daten von einem Mikrocomputer für die Ausgabe auf einen Plotter verarbeitet.

Parallel zu einer solchen Aufnahme der Spektren kann mit Hilfe einer Videokamera mit angeschlossenem Bildverstärker die Verteilung der Chromophore in der Linse beobachtet und makroskopisch eine Optimierung des zu messenden Fluoreszenzspektrums durchgeführt werden. Als Option ist der Anschluß von Bildaufzeichnungsgeräten, etwa einer Spezialkamera oder eines Videorekorders an das beschriebene System vorgesehen.

Die Strahlenbelastung des zu untersuchenden Auges ist äußerst gering. Da die Intensität des eingestrahlten Lichtes bei der im nahen Ultraviolett-Bereich liegenden Anregung bei 350 nm von derselben Größenordnung wie die des Sonnenlichtes an einem

trübten Wintertag liegt (wie von uns mehrfach gemessen wurde), und außerdem die Belichtungszeit durch die Verwendung der "OMA" so kurz wie möglich gehalten werden kann (es kann im Bereich von einigen tausendstel Sekunden gemessen werden), ist die Belastung des Patienten vernachlässigbar gering.

Hinweise auf Therapiemaßnahmen

Ein solches In-Vivo-Spektrometer erlaubt nicht nur eine wirkliche Früherkennung einer Katarakt oder die wesentlich exaktere Klassifizierung des Krankheitsstadiums als jede bisher existierende Methode in der Ophthalmologie, sondern kann dem behandelnden Arzt außerdem auch wertvolle

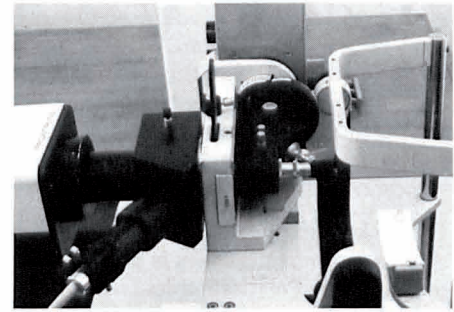


Abb. 6: Teilausschnitt des Geräts. Die Kopfhalterung für den Patienten ist am rechten Bildrand zu sehen.

Hinweise auf Therapiemaßnahmen liefern. So ist es z. B. geplant, die Fluoreszenzspektren mit der Härte der Linse, die bei fortschreitender Erkrankung zunimmt, zu korrelieren. Das ist vor allem für die Operationstechnik bei einer eventuell durchzuführenden Einpflanzung einer Kunstlinse von Bedeutung.

Da auch die Retina Fluoreszenzerscheinungen zeigt, scheint die Anwendung dieses Spektrometers nicht nur auf die Frage der Katarakt-Erkrankungen beschränkt zu sein.

Eine Gesamtübersicht über das Fluoreszenzspektrometer zeigt Abb. 5. Ein Teilausschnitt des Geräts mit der Kopfhalterung für den Patienten ist in Abb. 6 zu sehen.

Diese Untersuchungen wurden zum Teil aus Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Dieser Bericht wurde ermöglicht durch den tatkräftigen Einsatz vieler Mitarbeiter und durch eine ausgezeichnete Kooperation mit Kollegen der Universitätsaugenklinik Gießen.

	CATARACTA NUCLEARIS				
	control	incipiens	matura	hypermatura	
Na [µmol / 100mg dry mass]	7.7	15.0	42.3	46.5	
K "	27.8	21.7	8.2	9.0	
Ca "	0.1	1.1	2.4	2.9	
Mg "	0.87	0.88	0.92	1.05	
ASC _{tot} [µg / 100 mg fresh weight]	18.5	18.2	15.1	10.5	2.2
DHA { [µg / 100 mg fresh weight]	2.2	3.1	3.0	2.8	1.5
{ [% of ASC _{tot}]	11.8	16.8	19.8	26.6	6.8

Konzentrationen an totaler Ascorbinsäure (reduzierte + oxidierte Form, ASC_{tot}), Dehydroascorbinsäure (DHA) und einiger intrazellulärer Elektrolyte in menschlichen Linsen ohne (control) und mit verschiedenen Stufen der Cataracta nuclearis. Standardabweichung ≤ 10%.