

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
des Neuro- und Kopfzentrums
der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Richard

Der Einfluß von Hydroxylradikalen auf den Tonus von Ziliararterien

DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von Nick Wirtz
geboren in Wiesbaden
Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.08.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Klemm

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. K.-G. Schmidt

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. M. Augustin

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind publiziert worden:

Zeit O, Wagenfeld L, Wirtz N, Galambos P, Matthiesen N, Wiermann A, Richard G, Klemm M (2007) Influence of oxygen free radicals on the tone of ciliary arteries: a model of vasospasms of ocular vasculature. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 245:1327-33

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 HINTERGRÜNDE.....	6
1.2 HYPOTHESEN UND FRAGESTELLUNGEN.....	12
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 LÖSUNGEN	14
2.1.1 Stammlösung	14
2.1.2 Experimentierlösungen (Krebs-Henseleit).....	14
2.1.3 Dissektionslösung	16
2.1.4 Wasserstoffperoxid-Lösung für das Radikale-erzeugende-System.....	16
2.1.5 Fe-NTA-Lösung für das Radikale-erzeugende-System.....	17
2.1.6 Pyruvat	17
2.1.7 Radikale-erzeugendes-System.....	17
2.1.8 Depolarisierung	18
2.2 VERSUCHSAUFBAU.....	19
2.2.1 Aufbau des Organbades	19
2.2.2 Kreislauf der Experimentierlösung.....	20
2.2.3 Heizungssystem	21
2.2.4 Kraftaufnehmer.....	22
2.2.5 Pflege der Anlage	22
2.3 DATENAKQUISITION UND AUSWERTUNG	23
2.3.1 Überblick.....	23
2.3.2 Statistische Auswertung	23
2.4 PRÄPARATION – VOM SCHWEIN ZUR KONTRAHIERENDEN ZILIARARTERIE	24
2.4.1 Entnahme der Augen.....	24

2.4.2 Auswahl und Entnahme geeigneter Ziliararterien	24
2.4.3 Transfer der Präparate vom Präparierplatz in das Organbad	25
2.4.4 Einspannen des Muskels	25
2.4.5 Weitere Schritte bis zur kontrahierenden Arterie	25
2.4.6 Protokolle	27
3. ERGEBNISSE	28
4. DISKUSSION.....	33
4.1 Klinische Bezüge.....	35
4.2 Schlussfolgerung	36
5. ZUSAMMENFASSUNG	37
6. LITERATURVERZEICHNIS	39
DANKSAGUNG.....	46
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	47

1. Einleitung

1.1 Hintergründe

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Regulation des Gefäßtonus' glatter Muskelzellen und deren Interaktion mit Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress. Darüber hinaus soll ein Bezug dieser Prozesse zu verschiedenen vaskulären Erkrankungen hergestellt werden.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen der quergestreiften Skelett- und Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur innerer Organe und Blutgefäße. Die aufgeführten Überlegungen beziehen sich auf Prozesse an der glatten Muskelzelle. Grundsätzlich gibt es verschiedene Regulationsmechanismen, welche den basalen Tonus der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen. Dabei erfolgt die Anpassung des Gefäßtonus und damit verbunden das Ausmaß der regionalen Durchblutung über ein Zusammenspiel myogener, humoraler, lokal-chemischer und endothelialer Mechanismen (Schmidt/Lang, 2007). Diese sollen in den Grundzügen erläutert werden.

Ein wesentlicher Mechanismus stellt die mechanische Beeinflussung des Tonus dar, auch myogener Tonus oder Bayliss-Effekt genannt, welcher auf einer druckinduzierten Dehnung der Gefäßwände beruht. Vereinfacht dargestellt kommt es dabei zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle vom L-Typ und darauffolgend zum verstärkten Kalzium-Einstrom mit Kontraktion des Gefäßes (Moosmang et al, 2003). Der Bayliss-Effekt stellt den Grundmechanismus der Autoregulation der Organdurchblutung dar.

Ein zweiter Mechanismus ist die humorale Tonusmodulation durch zirkulierende Hormone, vor allem Katecholamine, Angiotensin, ADH und die natriuretischen Peptide. Die genannten Substanzen werden nach Aktivierung der verschiedenen endokrinen Systeme ausgeschüttet und beeinflussen den Tonus peripherer Gefäße im Sinne der wechselnden physiologischen Anforderung (Schmidt/Lang, 2007).

Einen dritten Mechanismus stellen lokal-chemische Gewebismetabolite dar, welche, bereits unter Ruhebedingungen aber besonders während erhöhter körperlicher Anforderung ausgeschüttet werden. Zu nennen sind vasoaktiv

wirksame, ionale Effekte wie Änderungen der Kalium- und Wasserstoffionenkonzentration sowie die Metabolite Histamin, Serotonin, Leukotrien, vasoaktive Epoxide und Eikosanoide. Letztere gehören zur Gruppe körpereigener Substanzen, die sowohl para- als auch autokrine Effekte besitzen und so den Gefäßtonus beeinflussen (Fleming, 2001; Jarajapu et al, 2004).

Neben diesen Mechanismen beeinflusst das Endothel selber den Gefäßtonus. Über die Bildung von vasoaktiven Substanzen nimmt es eine zentrale Rolle in der Modulation des Gefäßtonus ein. Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und Endothelin sind bedeutende vasoaktive Substanzen, welche vom Endothel gebildet werden und den Tonus beeinflussen (Mombouli, 1999; Fleming, 2001; Jarajapu et al, 2004). Darüberhinaus reguliert das Endothel den Tonus über die Aktivierung/Inaktivierung von zirkulierenden Metaboliten. Zu diesen Metaboliten zählen als eine wichtige Gruppe die Sauerstoffradikale, die im Mittelpunkt der nachfolgenden Ausführungen stehen. Dabei werden vor allem Überlegungen zur Interaktion zwischen Sauerstoffradikalen und der Gefäßmuskulatur gestellt. Sauerstoffradikale kommen sowohl intrazellulär als Signalmoleküle als auch bei verschiedenen Stoffwechselprozessen des Körpers vor. Intrazellulär können sie im Rahmen physiologischer Prozesse Signalkaskaden und redoxsensitive Transkriptionsfaktoren aktivieren (Ray et al, 2005; Dworakowski et al, 2006). Darüber hinaus gilt als wichtige Quelle von freien Sauerstoffradikalen das Elektronentransportsystem der mitochondrialen Atmungskette. Eine gewisse Rolle spielt zusätzlich u.a. die Autooxidation vieler niedermolekularer Stoffe in der Zelle. (Cadenas, 1989). Sauerstoffradikale besitzen somit eine wichtige Rolle für das Funktionieren der Zelle. Sie induzieren auch inflammatorische Prozesse oder Apoptose (Hancock et al, 2001). Sauerstoffradikale können also Bestandteil vieler physiologischer Stoffwechselprozesse sein.

Freie Sauerstoffradikale können jedoch auch ausserhalb der beschriebenen Prozesse auftreten und wirksam werden. Untersuchungen konnten zeigen, dass freie Sauerstoffradikale die Funktion eines Mediators bei vielfältigen Gewebeschäden einnehmen. Pereda et al und Severi et al konnten beschreiben, dass freie Sauerstoffradikale im Zusammenhang mit entzündlichen Reaktionen entstehen können (Pereda et al, 2006; Severi et al, 2006). Nach ischämischen Ereignissen konnte eine Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen von Vergely et al nachgewiesen werden (Vergely et al, 2001). Auch nach Zellschädigungen,

durch chemische oder physikalische Agenzien konnte erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen werden (Kim et al, 2006). Bei vielen Stoffwechselsituationen, wie z.B. nach körperlicher Arbeit (Urso et al, 2003), besonders aber bei Ischämien und der nachfolgenden Reperfusion (Sen et al, 1993), entstehen wirksame, freie Sauerstoffradikale. Des Weiteren führen Rauchen (Kode et al, 2006) und bestimmte Stoffwechselprozesse wie die Signaltransduktion in Gefäßzellen (Gutierrez et al, 2006) und in der Skelettmuskulatur (Jackson et al, 2006) zu erhöhten Radikalkonzentrationen. Freie Sauerstoffradikale können somit bei einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen entstehen und als Metabolite in wirksamen Konzentrationen vorliegen.

Dies ist vor allem deshalb interessant, da freie Sauerstoffradikale neben ihrer Rolle in physiologischen Stoffwechselprozessen eine deletäre Wirkung am glatten Gefäßmuskel im Sinne einer unphysiologischen Tonuserhöhung besitzen. Auch-Schwelk et al, Rhoades et al und Wiklund et al konnten nachweisen, dass freie Sauerstoffradikale Muskelkontraktionen auslösen und so zu Gefäßspasmen führen können (Auch-Schwelk et al, 1989; Rhoades et al, 1990; Wiklund et al, 1996). Der Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, ist aber durch das Auftreten eines 'Vasospasmus' aufgrund einer Interaktion mit Radikalen gekennzeichnet. Dies ist eine wichtige Beobachtung, da bei vielen Erkrankungen freie Radikale, Gefäßspasmen und regionale Durchblutungsstörungen eine zentrale pathophysiologische Rolle spielen können. Zum Beispiel mehren sich die Hinweise, dass bei verschiedenen neurologischen Gefäßerkrankungen oxidativer Stress und Sauerstoffradikale involviert sind. Dabei kam es nach der Interaktion zwischen freien Sauerstoffradikalen und der Gefäßmuskulatur zu einer Vasokonstriktion der Gefäße und zu einer Tonuserhöhung (Calabrese, 2005; Clark and Sharp, 2006). Auch die Raynaud-Erkrankung und die Prinzmetal-Angina scheinen durch Vasospasmen infolge Sauerstoffradikalwirkung gekennzeichnet zu sein (Gasser, 1991). In der Pathophysiologie von verschiedenen Erkrankungen des Auges spielen Vasospasmen und Radikale ebenfalls eine wichtige Rolle. Als Beispiel ist die Studie von Yamagishi et al zu nennen, welche einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung der diabetischen Retinopathie und oxidativem Stress aufzeigt (Yamagishi et al, 2008). Flammer bestätigt diese Annahme und weist mehr noch einen Zusammenhang von Vasospasmen mit anderen Augenerkrankungen wie dem Hornhautödem, dem arteriellen und venösen

Gefäßverschluss der Netzhaut, der Amaurosis Fugax und der anterioren ischämischen Optikusneuropathie auf (Flammer, 2001). Auch beim Krankheitsbild des Glaukoms mehren sich die Hinweise, dass dessen Entstehung, neben anderen Faktoren, mit der Wirkung von oxidativem Stress und Sauerstoffradikalen verbunden ist (Sacca et al, 2005; Gherghel et al, 2005; Tezel, 2006). Delaney et al. weist ebenfalls auf eine Involvierung von oxidativem Stress und Vasospasmen bei der Entwicklung des Glaukoms hin (Delaney et al, 2006).

Das Krankheitsbild des Glaukoms und dessen möglicherweise durch freie Sauerstoffradikale und oxidativen Stress bedingte Pathophysiologie soll in den nächsten Ausführungen eingehender behandelt werden. Es besteht die Vermutung, dass beim Glaukom eine wahrscheinlich primäre komplexe Durchblutungsstörung besteht, die durch eine gestörte Regulation des Vasotonus' mit Vasospasmen gekennzeichnet ist. Diese Vermutung soll im Folgenden näher erläutert werden. Dafür muss zum einen das Krankheitsbild des Glaukoms beschrieben werden um dann die verschiedenen Glaukomformen zu unterscheiden. Das ist wichtig, da die Theorie der vasospastisch bedingten Durchblutungsstörung nicht auf alle Glaukomformen zutrifft. Zum anderen soll die Vermutung erhärtet werden, ob eine überhaupt eine Durchblutungsstörung vorliegt und ob diese durch das Vorliegen von Vasospasmen gekennzeichnet sein könnte.

Unter einem Glaukom versteht man den fortschreitenden Untergang von retinalen Ganglienzellen mitsamt ihren Nervenfasern. Das klinisch morphologische Korrelat ist eine fortschreitende Optikusneuropathie mit zunehmender Papillenexkavation (Leitfaden der europäischen Glaukom-Gesellschaft, 2006). Die funktionellen Folgen sind Gesichtsfeldausfälle, die der Patient jedoch anfänglich nicht wahrnimmt. Als Ursache der Erkrankung wurde klassischerweise ein erhöhter Augeninnendruck angenommen, so dass man traditionell die verschiedenen Glaukomformen nach der Ursache der Augendrucksteigerung einteilt. Man unterscheidet dabei zwischen dem angeborenen, juvenilen Glaukom, das aufgrund einer fehlerhaften Anlage des Kammerwinkels oder Trabekelwerks entsteht und dem primär chronischen Offenwinkelglaukom mit erhöhtem Augeninnendruck, welches aufgrund einer Zunahme des Abflusswiderstandes im Trabekelwerk selber entsteht. Daneben gibt es weitere Glaukomformen, wie beispielsweise das Winkelblockglaukom, welches aufgrund einer plötzlichen Kammerwinkelverlegung zu einem akuten Augeninnendruckanstieg führt und die große Gruppe der

Sekundärglaukome, die aufgrund einer anderen Augenerkrankung, wie zum Beispiel einer Entzündung, zu einem erhöhten Augeninnendruck führen. Diese Glaukomformen haben gemeinsam, dass sie alle mit einem zu hohen Augeninnendruck einhergehen. Daneben existiert jedoch die Gruppe der primär chronischen Offenwinkelglaukome, bei welchen das Ausmaß der Augeninnendruckerhöhung sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Es gibt Patienten, die einen progressiven Nervenfaserverlust mit zunehmender Papillenexkavation und typischen Gesichtsfelddefekten aufweisen, aber niemals einen erhöhten Augeninnendruck haben. Per definitionem des Leitfadens der europäischen Glaukom-Gesellschaft leiden diese Patienten ebenfalls an einem Glaukom. Man bezeichnet diese Variante des primär chronischen Offenwinkelglaukoms als Normaldruckglaukom (Sommer, 1991). Diese Sonderform des primär chronischen Offenwinkelglaukoms soll näher erläutert werden. Es muss ihm eine andere Pathophysiologie zugrundeliegen, da es durch den bekannten Pathomechanismus des erhöhten intraokularen Druckes nicht ausreichend erklärt werden kann. Neben dem fehlenden erhöhten Augeninnendruck gibt es weitere, morphologische Unterschiede zwischen dem Normaldruckglaukom und dem Hochdruckglaukom. Die Studie von Martus konnte bei Glaukompatienten mit hohem Augeninnendruck Risikofaktoren detektieren, wie beispielsweise fortgeschrittenes Alter, verminderter neuroretinaler Randsaum, tiefe Exkavationen oder parapapilläre Atrophien, die bei Glaukompatienten mit normalem Augeninnendruck wesentlich seltener vorlagen. Bei diesen Patienten kam es besonders häufig zu Papillenrandblutungen und Veränderungen der Netzhautgefäße wie Einengungen der Arterien und Erweiterungen der Venen. Diese weisen auf Gefäßveränderungen hin und unterscheiden sich von den Morphologien, die bei Patienten mit hohem Augeninnendruck vorlagen (Martus et al., 2005; Flammer, 2001). Daher erscheint es notwendig, eine Differenzierung der Glaukomformen in Abhängigkeit vom Augeninnendruck vorzunehmen und es stellt sich zwangsläufig die Frage, welcher Mechanismus insbesondere beim Normaldruckglaukom einen schädlichen Einfluss auf den Sehnervenkopf ausübt.

In diesem Zusammenhang wird eine reduzierte Durchblutung des Sehnervenkopfes als Risikofaktor für die Entstehung des Normaldruckglaukoms diskutiert. Schumann et al konnte in einer Studie zeigen, dass zwischen dem retrobulbären Blutfluss und der Glaukomschädigung eine signifikante Korrelation

besteht, die interessanterweise unabhängig vom Augeninnendruck vorliegt. Dabei konnte bei Patienten mit progressivem Gesichtsfeldverlust im Rahmen des Offenwinkelglaukoms eine Erniedrigung der Blutflussgeschwindigkeit der A. ophthalmica und ein erhöhter Widerstand der A. centralis retinae gemessen werden (Schumann et al, 2000). Diese Beobachtung wird durch die Studien von Yamazaki et al, Gherghel et al und Galassi et al gestützt, welche ebenfalls erniedrigte Blutflussgeschwindigkeit und erhöhten Gefäßwiderstand bei Patienten mit Gesichtsfeldverlust und normalen Augeninnendruck nachweisen konnten (Yamazaki et al, 1997; Gherghel et al, 2001; Galassi et al, 2003). Die Studie von Galambos et al, welche die systolischen und enddiastolischen Blutflussgeschwindigkeiten in den kurzen hinteren Ziliararterien und der A. centralis retinae abhängig vom Lagewechsel des Glaukompatient mit dem des gesunden Probanden verglich, ist ebenfalls für diese Überlegung von Bedeutung. In der Gruppe der Glaukompatienten war nach der Lageänderung eine signifikante Verminderung der Blutflussgeschwindigkeit feststellbar, in der Gruppe der Gesunden nicht. Dies weist auf eine insuffiziente Regulation des Blutflusses in den retrobulbären Gefäßen von Glaukompatienten nach Lageänderung hin (Galambos et al, 2006). Es liegen somit Hinweise für eine zentrale Bedeutung der verminderten Sehnervenkopfdurchblutung in der Pathogenese des Normaldruckglaukoms vor.

Durch die Beobachtungen der angeführten Studien kann man schliessen, dass eine verminderte Durchblutung des Sehnervenkopfes einen wichtigen Faktor in der Entstehung des Normaldruckglaukoms darstellt. Im Mittelpunkt stehen dabei Überlegungen zu Veränderungen der Durchblutung aufgrund von Vasospasmen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Gefäßregulation von Patienten mit primär chronischem Offenwinkelglaukom aufgrund von Vasospasmen abnorm verändert ist. Man konnte nach provozierten Temperaturänderungen Kapillarspasmen nachweisen, welche gesunde Probanden nicht aufwiesen (Gasser et al, 1991; Gherghel et al, 2004). Prunte et al konnte ergänzend dazu einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen lokalen Vasospasmen und einer veränderten Autoregulation des Blutflusses geben (Prunte et al, 1998). Haufroid et al zeigte ebenfalls auf, dass Vasospasmen eine veränderte Autoregulation der Gefäße zur Folge haben und im Zusammenhang mit der glaukomatösen Optikusneuropathie stehen. Dabei treten Vasospasmen interessanterweise gehäuft im Sinne eines

vasospastischen Syndroms auf. Das bedeutet, dass diese Patienten auf Stimuli wie Kälte und emotionalen Stress mit Spasmen reagieren und gehäuft an vasospastischen Symptomen wie kalten Akren, niedrigem Blutdruck und Migräne leiden (Haufröid et al, 2004). Auch Delaney et al weist auf eine Involvierung von Vasospasmen bei der Entwicklung des Glaukoms hin (Delaney et al, 2006).

Ausgehend von den aufgeführten Beispielen kann die Vermutung erhärtet werden, dass bei der Entstehung des Normaldruckglaukoms eine verminderte Durchblutung und eine gestörte Autoregulation des Gefäßtonus' eine wichtige Rolle spielt. Diese Durchblutungsstörungen könnten durch Vasospasmen gekennzeichnet sein, da Vasospasmen im Zusammenhang mit vielen vaskulären Erkrankungen und dabei insbesondere auch an Gefäßen des Auges beobachtet werden. Man kann darüberhinaus feststellen, dass freie Radikale Vasospasmen auslösen können. Diese Radikalwirkung könnte bei der Pathophysiologie des Normaldruckglaukoms eine wichtige Rolle spielen.

1.2 Hypothesen und Fragestellungen

Wie aus den vorangegangenen Ausführungen hervorgeht, spielen Sauerstoffradikale bei einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen eine zentrale Rolle. Sie können dabei neben ihrer physiologischen Funktion auch deletäre Wirkungen wie zB. auf Gefäße im Sinne eines Vasospasmus' entfalten.

Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist, dass bei vielen Gefäßerkrankungen oxidativer Stress und Sauerstoffradikale involviert sind und zu einer Tonuserhöhung führen können. Auch beim Normaldruckglaukom kann eine Fehlregulation des Gefäßtonus' beschrieben werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Gefäße des Auges von Glaukompatienten oxidativem Stress, in Form von freien Radikalen, ausgesetzt sind (Sacca et al, 2005; Gherghel et al, 2005). Dies könnte sich negativ auf die Durchblutung des nachgeschalteten Gewebes auswirken.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Vermutung ist, dass freie Radikale den Gefäßtonus von Ziliararterien beeinflussen können. Es wird angenommen, dass

Radikale zu Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur an Ziliararterien führen, der Gefäßtonus sich also unter dem Einfluss von oxidativem Stress erhöht.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen

2.1.1 Stammlösung

Dissektionslösung und Experimentierlösung wurden kurz vor Gebrauch aus einer 10-fach konzentrierten Stammlösung hergestellt, die alle Inhaltsstoffe in 10-facher Konzentration enthielt, außer

- 2,3-Butane-Dione-Monoxime (BDM)
- Glucose
- Calciumchlorid und
- 2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperan-zinyl]-ethansulfonsäure (HEPES)

Die fehlenden Stoffe wurden bei Herstellung der Dissektions- oder Experimentierlösung in der jeweils benötigten Menge direkt zugegeben. Die Stammlösung wurde nie länger als drei Wochen aufbewahrt und verwendet.

2.1.2 Experimentierlösungen (Krebs-Henseleit)

Die nachfolgend beschriebenen Lösungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Konzentration an Kaliumchlorid und Natriumchlorid und dienen als Basislösungen für die Experimente. Zusätze, wie z.B. für das Radikale-erzeugende-System, wurden diesen Lösungen, wie genauer an entsprechender Stelle in diesem Kapitel beschrieben, zugesetzt. Die Relaxierungslösung enthielt folgende Stoffe in den angegebenen Konzentrationen:

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl_2	116,0mM
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10,0mM
Kaliumchlorid	KCl	5,0mM
Calciumchlorid	CaCl_2	2,5mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH_2PO_4	2,0mM
Magnesiumchlorid	MgCl_2	1,2mM
Natriumsulfat	Na_2SO_4	1,2mM
HEPES		20mM

Die Aktivierungslösung enthielt folgende Stoffe in den angegebenen Konzentrationen:

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl_2	5,0mM
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	10,0mM
Kaliumchlorid	KCl	120,0mM
Calciumchlorid	CaCl_2	2,5mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH_2PO_4	2,0mM
Magnesiumchlorid	MgCl_2	1,2mM
Natriumsulfat	Na_2SO_4	1,2mM
2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl]-ethansulfonsäure HEPES		20mM

Um die Dosis-Wirkungskurve zu erstellen war es notwendig, Experimentierlösungen in den folgenden Zwischenschritten zu verwenden. Die Kaliumkonzentration wurde auf 10mM, 30mM, 60mM und 90mM erhöht; um die Gesamtosmolarität auszugleichen, wurde die NaCl- Konzentration entsprechend reduziert. Die in den Tabellen angegebenen Calciumchlorid-Konzentrationen entsprechen der Endkonzentration. Zur Einstellung des pH-Werts auf 7,4 wurde mittels 1-molarer Salzsäure und 1-molarer Natronlauge titriert und 20mM des Puffersystems HEPES hinzugegeben. Zur Anreicherung mit Sauerstoff wurde die Experimentierlösung während des Versuchs mit medizinischem Sauerstoff (ca. 98% O_2) begast.

2.1.3 Dissektionslösung

Die Dissektionslösung bestand aus 2,3-Butane-Dione-Monoxime (BDM), in die das Schweineauge direkt nach dem Transport in die Klinik überführt wurde. In ihr erfolgte die Präparation und das Präparat wurde bis zum Abschluß des Einspannens in die Anlage, in dieser Lösung belassen. Die Zusammensetzung war ähnlich wie die der Experimentierlösung. Die Unterschiede sind mit einem Stern (*) vor der Bezeichnung des Stoffes hervorgehoben:

Bezeichnung	Summenformel	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl ₂	116,0mM
* 2,3-Butane-Dione-Monoxime (BDM)	C ₄ H ₇ NO ₂	20,0mM
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	10,0mM
Kaliumchlorid	KCl	5,0mM
Natrium-di-Hydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	2,0mM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	1,2mM
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	1,2mM
* Calciumchlorid	CaCl ₂	0,2mM

BDM blockiert die Querbrückenbildung der Myofilamente und senkt dadurch den Sauerstoffverbrauch des Gewebes (Vahl et al, 1995; Jayawant et al, 1999). Ebenso wie die Experimentierlösung wurde auch die Dissektionslösung auf einen pH-Wert von 7,4 titriert (siehe Kapitel 2.1.1)

2.1.4 Wasserstoffperoxid-Lösung für das Radikale-erzeugende-System

Als Ausgangslösung wurde 30%-iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) der Firma Merck verwendet. Dies entspricht einer Konzentration von 9,79mol/l. Von dieser Lösung wurden unmittelbar vor dem Experiment 400µl mit 50ml der Experimentierlösung gemischt. Dies entspricht einer Wasserstoffperoxid-Konzentration von 4mM. Alle Vorgänge, bei denen mit Wasserstoffperoxid gearbeitet wurde, fanden in einem abgedunkelten, nur mit einem schwachen Licht beleuchteten Raum statt, um die Dissoziation des H₂O₂ durch Licht zu verhindern.

2.1.5 Fe-NTA-Lösung für das Radikale-erzeugende-System

In Anlehnung an ein von Teichmann beschriebenes Verfahren wurde eine 1mM Lösung des Chelat-Komplexes aus dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) und Nitrilotriacetat (NTA) – $\text{Fe}^{3+} 2 [\text{NTA}]$ – wie folgt hergestellt:

In 25ml eines 40mM Hepes/TRIS-Puffers (pH 6,0) wurden 50 μmol Eisen-3-Chlorid ($\text{FeCl}_3[6 \text{H}_2\text{O}]$, MW 270,30g) und 100 μmol Nitrilotriacetat (NTA, MW 191,10g) unter Rühren gelöst. Die fertige Lösung wurde mit 1N Natronlauge (NaOH) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschließend mit Aqua bidest. auf 50ml aufgefüllt.

2.1.6 Pyruvat

Vor Gebrauch im Rahmen der Pyruvat-Versuchsreihe wurde 1mM Pyruvat der Lösung zugegeben. Es wurde für jeden Versuch frisch angemischt.

2.1.7 Radikale-erzeugendes-System

Für diese Arbeit wurden Hydroxylradikale verwendet, die in einem System aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter Katalyse von dreiwertigem Eisen generiert wurden. Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) entstehen hier über die Fenton-/Haber-Weiss-Reaktionen:



Als Summe aus den Gleichungen (1) und (2) ergibt sich folgende Reaktion:



Eisen wird mit Nitrilotriacetat komplexiert, um es in gelöster Form zu stabilisieren (siehe Kapitel 2.1.6). Nähere Angaben dazu finden sich im Kapitel Versuchsaufbau.

2.1.8 Depolarisierung

Das Potential, bei dem elektrische und chemisch-osmotische Kräfte im Gleichgewicht sind, ist das Gleichgewichtspotential. Man kann dies nach der Nernst-Gleichung berechnen (aus Silbernagel, 2001).

Das Gleichgewichtspotential nach Nernst (bei 37°C) liegt bei

$$E = -61 \text{ mV} \times \log_{10} \left(\frac{[\text{K}^+]_e}{[\text{K}^+]_i} \right).$$

Die maximale Depolarisierung erfolgte bei $E = -4 \text{ mV}$ mit der Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 120 mM und die Polarisation erfolgte bei $E = -61 \text{ mV}$ mit der Erniedrigung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 5 mM, wie in oben genannten Lösungen angegeben.

Die maximale Depolarisierung erfolgte bei -4 mV , die halbmaximale Depolarisierung bei -41 mV .

2.2 Versuchsaufbau

Vor der Beschreibung des Versuchsaufbaus sollte darauf hingewiesen werden, dass alle Versuche auf zwei teilweise zusammenhängenden Anlagen parallel durchgeführt wurden. Gemeinsam genutzte Komponenten beider Anlagen waren die Pumpe für die Experimentierlösungen, der Perfusor und der Computer zur Datenerfassung. Die Flüssigkeitskreisläufe beider Anlagen waren aber getrennt, so dass unterschiedliche Protokolle (z.B. Intervention und zugehöriges Kontrollexperiment) parallel durchgeführt werden konnten. Im Aufbau waren beide Anlagen identisch, weshalb die folgende Beschreibung von nur einer Versuchsanordnung ausgeht.

2.2.1 Aufbau des Organbades

Im Zentrum der Anlage stand das so genannte Organbad, in dem sich das Muskelpräparat umspült von Experimentierlösung befand. Der detaillierte Aufbau des Bades ist der Querschnittszeichnung in Abb. 1 zu entnehmen. Das Bad besteht aus einer kleinen Wanne, die in eine etwa 10mm dicke Plexiglasscheibe gefräst wurde.

In die Wanne tauchten zwei Haken zur Befestigung des Präparats ein. Dabei wurde der eine Haken so positioniert, dass er sich genau gegenüber dem anderen befand.

Der eine Haken ist mit einer Mikrometerschraube verbunden, so dass man ihn langsam längs des Bades bewegen kann, um den Muskel vorzudehnen. Der Haken auf der anderen Seite ist starr mit einem Kraftaufnehmer „KG7“ der Firma Scientific Instruments, Heidelberg, verbunden. Die Verbindung zwischen Kraftaufnehmer, Mikrometerschraube und den beiden Haken wurde aus einer kliniküblichen Stahlkanüle hergestellt.

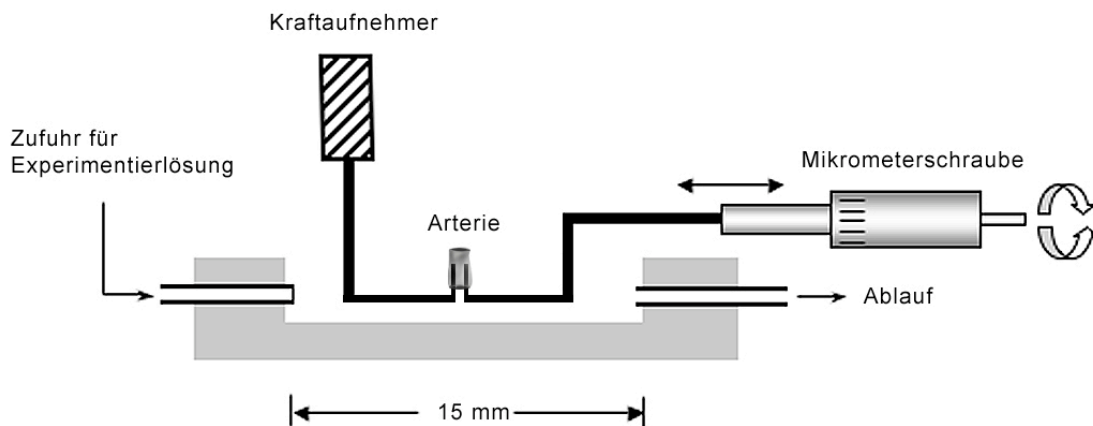


Abb. 1 Aufbau des Organbades

2.2.2 Kreislauf der Experimentierlösung

Mit einer Pumpe wird die Experimentierlösung aus dem Vorratsbehälter in das Organbad befördert. Auf der dem Zulauf des Organbades gegenüberliegenden Seite befindet sich ein Ablauf, über den die Experimentierlösung abgesaugt wird. Von dort gelangt die Experimentierlösung über eine Pumpe wieder zurück in den Vorratsbehälter. Die Geschwindigkeit der Pumpe wurde so gewählt, dass in einer Sekunde der halbe Flüssigkeitsinhalt des Organbades ausgetauscht wurde.

Neben diesem Kreislaufsystem gab es einen zweiten Zulauf zum Organbad. An ihn war ein kliniküblicher Perfusor der Firma B. Braun angeschlossen, so dass hier genau dosiert und kontinuierlich geringste Mengen einer Flüssigkeit in das Organbad eingespeist werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zulauf für die Zugabe von Wasserstoffperoxid verwendet. Mehr dazu ist in den Kapiteln 2.1.3 und 2.1.6 zu finden. Siehe dazu auch Abb. 2.

Alle Teile des Leitungssystems für die Experimentierlösung waren aus Kunststoff, um Einflüsse auf das Radikale-erzeugende-System zu vermeiden. Es wurden weitgehend klinikübliche Standardartikel mit Luer-Lock-System wie Infusionsleitungen, Perfusorschläuche und Verbindungsstücke gewählt.

Sowohl Zu- als auch Ablauf beider parallel betriebener Anlagen wurden von derselben Pumpe angetrieben. Es handelte sich dabei um eine Peristaltikpumpe mit vier Kanälen. Der Ablauf des Organbades lief über größerlumige

Pumpenkanäle, um sicher zu verhindern, dass das Bad durch ein Übergewicht der Zufuhr überlief.

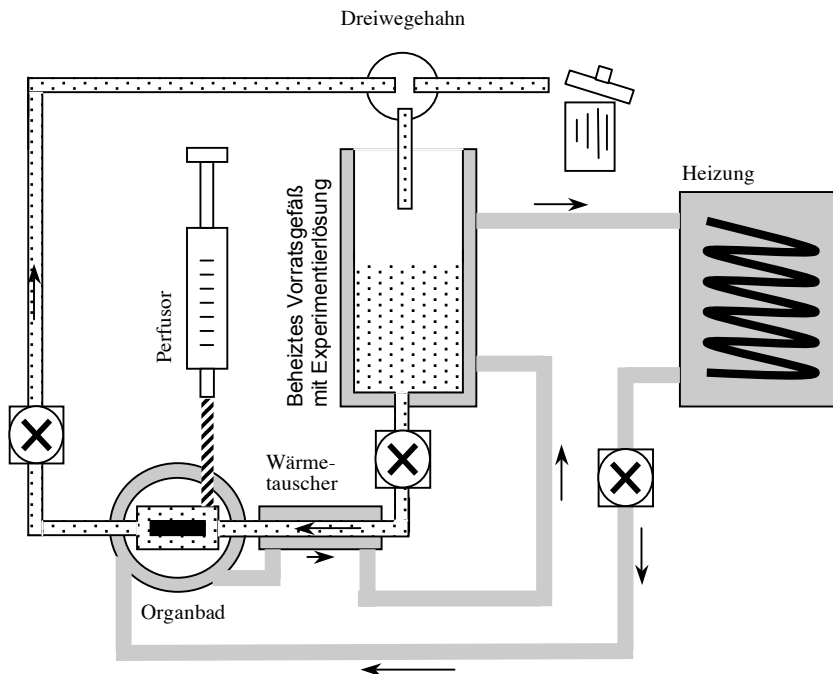


Abb. 2 Kreislauf der Experimentierlösung

2.2.3 Heizungssystem

Das Heizungssystem wurde benutzt, um die Temperatur der Experimentierlösung auf einen Wert im Bereich der Körpertemperatur zu erhöhen.

Kernstück der Heizung war das Wasserbad der Firma Lauda Typ RE109. Das gewärmte Wasser wurde direkt aus dem Vorratsbehälter des Wasserbades in ein großlumiges Schlauchsystem gepumpt. Daran schließt sich ein selbst gebauter Wärmetauscher an, in dem das Heizmittel seine Wärme an die Experimentierlösung abgeben kann, kurz bevor diese in das Organbad strömt.

Die Heizleistung wurde so eingestellt, dass die Temperatur im Organbad zwischen $36,0^{\circ}\text{C}$ und $36,5^{\circ}\text{C}$ lag. Die erforderliche Heiztemperatur dafür betrug in der Anlage $38,5^{\circ}\text{C}$.

2.2.4 Kraftaufnehmer

Zur Messung der Kraft wurde ein Kraftaufnehmer (KG7) und ein Brückenverstärker (DUBAM4C) von der Firma Scientific Instruments, Heidelberg, verwendet. Vor Gebrauch wurde der Kraftaufnehmer geeicht.

2.2.5 Pflege der Anlage

Nach jedem Experiment wurde die Anlage mit 200ml sterilem Aqua dest. durchgespült. Alle zwei Wochen wurde die komplette Anlage mit 25%-iger Essigsäure gespült.

Bei Verunreinigungen oder Beschädigungen wurden die betroffenen Teile ausgetauscht. Besonders das Schlauchsystem hatte eine erhöhte Verschleißrate und wurde deshalb regelmäßig ausgewechselt.

2.3 Datenakquisition und Auswertung

2.3.1 Überblick

Wie im Kapitel über den Versuchsaufbau dargelegt, war das Muskelpräparat über den Haken mit einem Kraftaufnehmer verbunden. Das elektrische Potential am Kraftaufnehmer war proportional zur angelegten Kraft.

Auf dem Computer lief während des Experiments ein von der Arbeitsgruppe selbst entwickeltes Programm auf Basis von LabView der Firma National Instruments (Austin, TX, USA) zur Datenakquisition. Die digitalisierten Informationen wurden in Dateien abgelegt, die nach Abschluss des Versuchs mit Hilfe eines ebenfalls selbst entwickelten Analyseprogramms ausgelesen wurde. Die Ergebnisse der Analyse wurden in Textdateien abgelegt. Diese konnten von Microsoft Excel eingelesen werden, um dann statistisch und grafisch weiter bearbeitet zu werden.

Beide Anlagen nutzten gemeinsam einen Rechner. Die verwendete LabView-Applikation war darauf ausgelegt, mehrere Kanäle der Wandlerkarte zu überwachen, so dass mit einem Programm gleichzeitig Daten aus beiden parallelen Experimenten aufgezeichnet und ausgewertet werden konnten.

2.3.2 Statistische Auswertung

Die konvertierten Versuchsdaten wurden in Microsoft Excel importiert und dort weiter bearbeitet. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student-t-Test für unverbundene oder verbundene Stichproben bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,05$ festgesetzt.

2.4 Präparation – Vom Schwein zur kontrahierenden Ziliararterie

2.4.1 Entnahme der Augen

Die Augen wurden in einem Schlachtbetrieb dem Schwein entnommen und der Augenklinik angeliefert. Dort angekommen, wurden die Augen unverzüglich in BDM-haltige Dissektionslösung überführt und gekühlt. Während aller weiteren Präparationsschritte verblieben die Augen in der Dissektionslösung und wurden weiterhin gekühlt.

2.4.2 Auswahl und Entnahme geeigneter Ziliararterien

Unter einem Präparationsmikroskop wurde am exzidierten Auge bei etwa 12-facher Vergrößerung das rückseitig gelagerte Auge und der austretende Sehnerv dargestellt und auf geeignete Arterien untersucht. Als brauchbar anzusehen sind unverzweigte, frei der Lederhaut aufliegende Arterien mit einem Durchmesser von 500 bis 1000µm.

Grundsätzlich wurde bei der Entnahme der Arterien darauf geachtet, dass der Teil des Präparates, der später die Kraft liefern sollte, nicht berührt oder gedehnt wurde. Dies bedeutete für die Präparation, dass die Gefäße nur an der Adventitia oder umliegenden Bindegewebe mit der Pinzette angefasst werden durften, wohingegen eine Manipulation der Media oder Intima vermieden werden musste. Die Mobilisierung sollte so schonend wie möglich erfolgen, da das Kontraktionsverhalten eines Gefäßringes durch Präparationsfehler negativ beeinflusst wird. Die weitere Präparation war dann durch die Anforderungen der Haken-Haken-Aufhängung in der Anlage bestimmt (siehe Abb. 1). Die Arterie wurde möglichst ohne anhaftendes Gewebe entnommen.

2.4.3 Transfer der Präparate vom Präparierplatz in das Organbad

An der Anlage wurde zunächst die Umwälzpumpe für die Experimentierlösung abgeschaltet. Dann wurde die Arterie in das Organbad gegeben, so dass sie zunächst frei in der Lösung schwamm. Auf diese Weise war es möglich, die Arterie näherungsweise berührungsfrei an seinen Bestimmungsort zu transportieren.

2.4.4 Einspannen des Muskels

Wie in der Beschreibung der Experimentieranlage (vgl. Abb. 1) dargelegt, stehen sich die beiden Haken senkrecht und parallel zueinander ausgerichtet gegenüber. Wichtig war hierbei vor allem, dass die Spitzen der beiden Haken sich berührten und so parallel wie möglich nebeneinander standen, da sonst ein Eintreten beider Haken in das kleine Arterienlumen unmöglich war. Die Arterie wurde so über die beiden Haken gezogen, dass sie genau in der ihr zugeordneten Position zu liegen kommt. Dafür wurde das Lumen der Arterie durch mehrmaliges Untertauchen in der Reaktionslösung soweit durchgespült und geöffnet, dass überhaupt erst ein Eintreten der Haken in das Lumen möglich wurde. Für das Überziehen wurden zwei feine Pinzetten und ein Präparationsmikroskop benutzt.

2.4.5 Weitere Schritte bis zur kontrahierenden Arterie

Nachdem die Arterie sicher im Organbad über beide Haken gezogen war, wurde die Umwälzpumpe wieder eingeschaltet, um die Zirkulation der Lösung zu gewährleisten. Dann wurde mittels der Mikrometerschraube der an ihr befestigte Haken von dem anderen Haken wegbewegt. Hierbei kam es zu einer Entfaltung des Arterienlumens und infolgedessen zu einem Spannungsanstieg an dem am anderen Haken befestigten Kraftaufnehmer. Der Haken wurde nur genau soweit wegbewegt, bis gerade ein konstanter Spannungszustand der Arterie von der Software registriert wurde. Jetzt konnte mit der eigentlichen Vordehnung der Arterie mit 12mN begonnen werden. Dieser Wert wurde in vorhergehenden Experimenten ermittelt. Bei diesem Wert konnte die größtmögliche Kontraktion erreicht werden. Anhand der in Echtzeit registrierenden Software konnte genau der angegebene Wert vorgedehnt und die Mikrometerschraube an entsprechender

Position gestoppt werden. Das Gefäß begann die Dehnung zu kompensieren, indem es relaxierte. Diese Relaxierung war gewünscht und senkte den registrierten Spannungszustand bis auf das Ausgangsniveau zurück. Es dauerte ca. 30 Minuten bis die Relaxierung beendet war.

Um sicher zugehen, dass das Gefäß bei der Präparation nicht zu sehr beschädigt wurde oder aus einem anderen Grund funktionsunfähig war, wurde eine Testung der Kontraktionsfähigkeit vorgenommen. Zu diesem Zweck wurde die Relaxierungslösung ausgewechselt und die Aktivierungslösung in das Schlauchsystem eingespeist. Durch die hohe Kaliumkonzentration der Aktivierungslösung von 120mM/L depolarisierte das Membranpotential der muskulären Zellen der Arterie auf -4mV und verursachte eine Vollkontraktion des Gefäßes. Diese wurde registriert und ab einer Amplitude von mindestens 1mN als adäquat bewertet. Bei geringeren Kräften musste von einer Verletzung des Gefäßes während der Präparation ausgegangen werden. Um das Membranpotential wieder zu polarisieren wurde die Aktivierungslösung erneut gegen die Relaxierungslösung ausgewechselt und somit eine Relaxierung auf Ausgangsniveau erreicht.

Der Experimentierlösung wurde dann, dem jeweiligen Protokoll folgend, vor dem Eintritt in das Schlauchsystem Fe^{3+} -NTA in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben (5 μml der im Kapitel 2.1 beschriebenen Fe^{3+} -NTA-Lösung auf 50ml Experimentierlösung). Um das Präparat freien Radikalen auszusetzen, wurde Wasserstoffperoxid über einen kliniküblichen Perfusor (siehe Anlagenbeschreibung in Kap. 2.3.2) dem Bad in entsprechender Menge direkt zugesetzt. Die Perfusorspritzen, die H_2O_2 enthielten, waren aus schwarzem, lichtundurchlässigem Plastik

Die aus dem Bad abgeflossene Peroxid-, bzw. OFR-haltige Experimentierlösung wurde nicht zurück in das Vorratsgefäß gepumpt, sondern direkt verworfen. Dadurch sollten Effekte durch eventuell zirkulierendes Peroxid oder im System kreisende freie Sauerstoffradikale von vornherein ausgeschlossen werden, auch wenn bekannt ist, dass sie wenig stabil sind.

Die Expositionsdauer gegenüber OFR betrug je nach Protokoll zwischen zehn Sekunden und zwei Minuten. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass der Muskel diese Zeitspanne unter OFR relativ gut übersteht, d.h. dass er nach einer gewissen

Erholungszeit wieder stimulierbar war. Zugleich war aber die im Ergebnisteil eingehend beschriebene Kontraktur als akute Folge der Radikalexposition deutlich ausgeprägt.

2.4.6 Protokolle

Das erste Protokoll diente der Entwicklung einer Dosis-Wirkungskurve für Kalium. Es wurde wie folgt vorgegangen: Ausgehend von der niedrigen Kaliumkonzentration von 5mM in der Experimentierlösung, wurden für jeweils mindestens 15 Minuten nacheinander in aufsteigenden Konzentrationen Lösungen mit 10mM, 30mM, 60mM, 90mM und 120mM (die Lösungen werden im Kapitel 2.1.1. beschrieben) in das Organbad eingeleitet. Die Lösungen wurden nach jedem Gebrauch verworfen. Dabei wurde die entwickelte Kontraktionskraft F der jeweils entsprechenden Kaliumkonzentration gemessen. Danach wurde das Gefäß mittels der Ausgangskonzentration von 5mM relaxiert. Aus den gewonnenen Daten ließ sich eine Beziehung zwischen Kaliumkonzentration und der resultierenden Wirkung auf das Gefäß darstellen.

Das zweite Protokoll diente der Untersuchung der Radikalexposition des Gefäßes über einen definierten Zeitraum. Das Gefäß wurde halbmaximal vorkontrahiert, was nach der Konzentrationskurve für Kalium (Kapitel Ergebnisse, Abb. 1) bei ca. -41mV der Fall war, so dass die entwickelte Kontraktionskraft zwischen 40% und 60% des Maximums lag. Es wurden zwei Gruppen gebildet. Die eine Gruppe enthielt einen Zusatz von 1mM Pyruvat in der Reaktionslösung, die andere Gruppe nicht. Die Einleitung der Radikale erfolgte wie in Kapitel Radikale erzeugendes System beschrieben. Somit konnte der Effekt der freien Radikale auf die Gefäßkontraktur sowohl mit als auch ohne Pyruvatzusatz getestet werden. Die Expositionszeit lag in der ersten Versuchsreihe bei zehn Sekunden, in der zweiten Versuchsreihe bei 20 Sekunden und in der dritten Versuchsreihe bei zwei Minuten. Die Lösungen wurden nach jedem Gebrauch verworfen.

3. Ergebnisse

In der ersten Serie wurde eine Dosis-Konzentrationskurve für Kalium erstellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 gezeigt und sind mittels des Wertes der Volldepolarisierung normalisiert worden (in mN). Bei einem Potential von näherungsweise -20mV lag die maximale Kraftentwicklung vor, eine halbmaximale Kraftentwicklung bei -41mV.

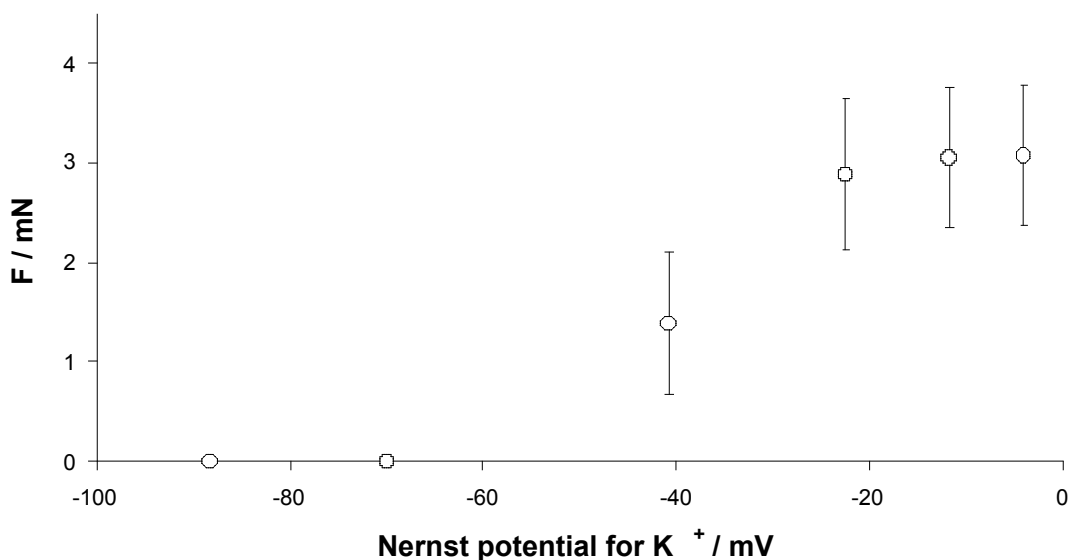


Abb.3 Dosis-Konzentrationskurve Kalium n=5

Bei präaktivierten Arterienringen erfolgt die Radikalexposition. Diese Exposition resultiert in einer Zunahme der entwickelten Kraft, so wie sie in Abb. 4 dargestellt wird. Diese Zunahme der Kontraktion war reversibel.

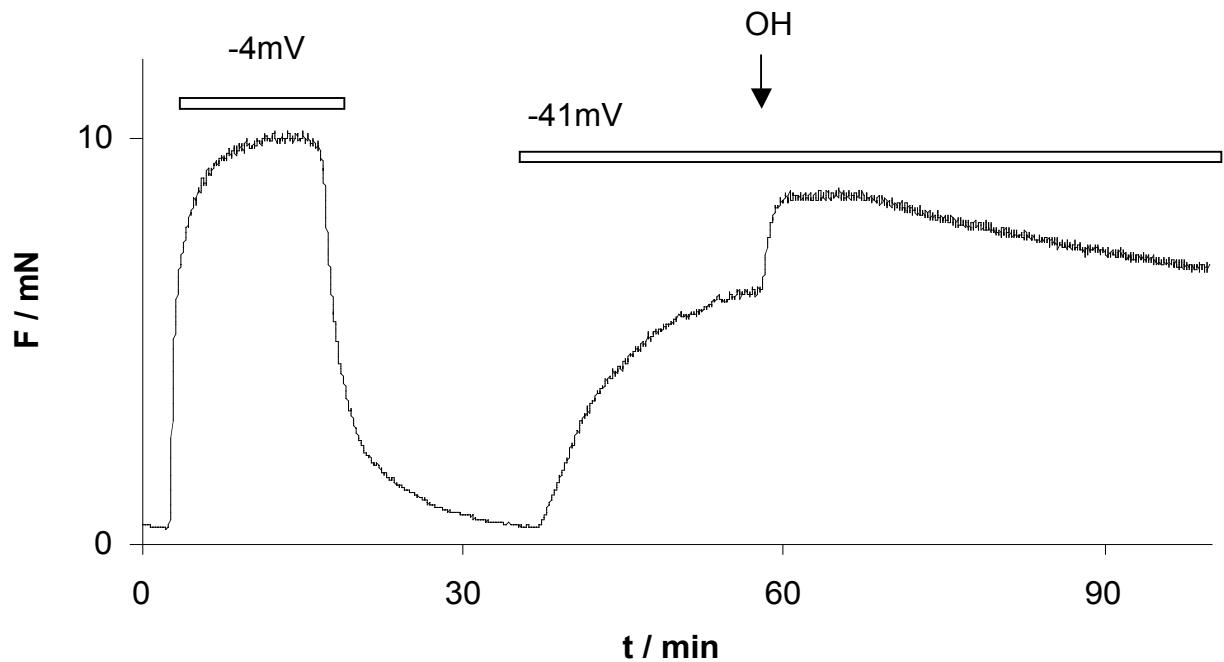


Abb. 4 Originalaufzeichnung eines Experimentes mit Radikalen. Um einen Bezugswert für eine spätere Evaluierung zu erhalten, wurde das Präparat auf -4mV depolarisiert und anschließend relaxiert. Dann erfolgte eine Präaktivierung auf den halbmaximalen Bezugswert mittels Depolarisierung auf -41mV . Wenn die entwickelte Kraft stabil war, wurde es mit Radikalen behandelt.

Die gemittelten Daten für alle Experimente sind in Tab. 1 und Abb. 5 dargestellt. Alle drei Expositionszeiten zeigten einen signifikanten Anstieg der Kontraktionskraft, wobei die Höhe der Amplitude unabhängig von der Expositionszeit war.

	-41mV	-41mV+OH	Statistik
10s	0.35 ± 0.08	0.62 ± 0.12	$P=0.003; n=8$
20s	0.46 ± 0.08	0.78 ± 0.10	$P=0.02; n=5$
60s	0.40 ± 0.09	0.60 ± 0.07	$P=0.03; n=6$

Tab. 1 Entwickelte Kraft unter Radikalexposition, Normalisierung erfolgte mittels der Werte der Depolarisierung auf -4mV . Alle drei Expositionszeiten mit Radikalen führten zu einem signifikanten Anstieg der entwickelten Kraft.

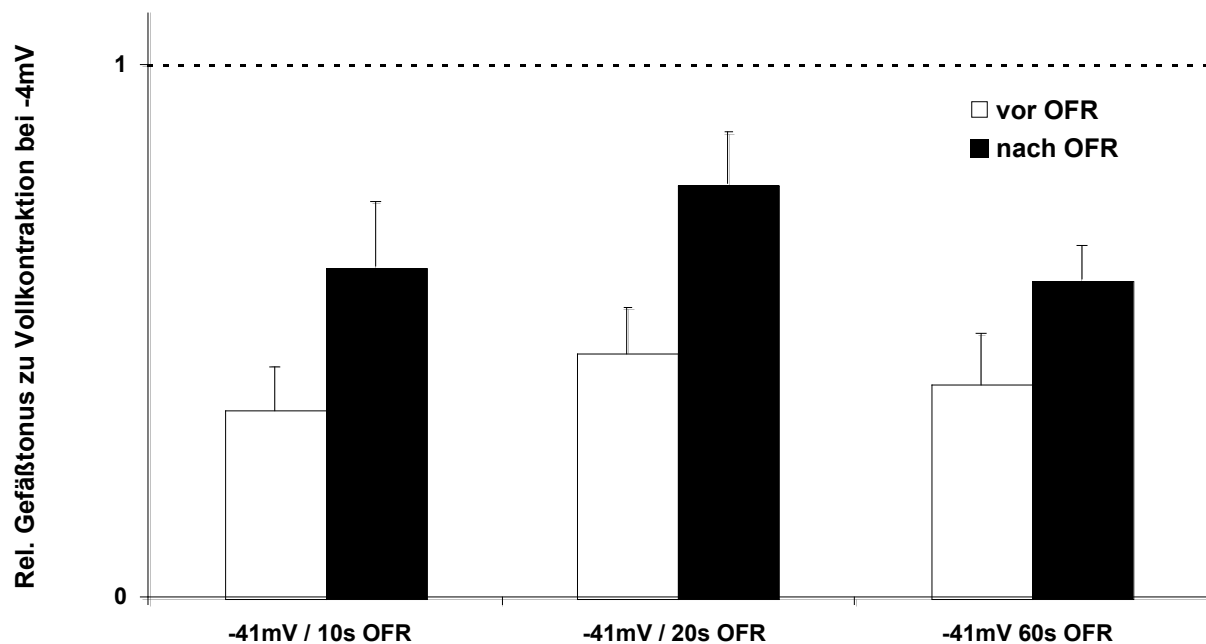


Abb. 5 Relative Zunahme des Gefäßtonus' nach Radikalexposition

30 Minuten nach der Radikalexposition wurden die Arterienringe relaxiert und auf –4mV depolarisiert, um die Wirkung der Radikale auf die verbliebene Kontraktionskraft zu testen.

Nach zehn Sekunden Expositionszeit wurde eine entwickelte Kraft nach Depolarisierung auf -4mV von 0.84 ± 0.13 gemessen, normalisiert auf die initiale Maximalkontraktion (n=8).

Nach 20 Sekunden Expositionszeit wurde eine entwickelte Kraft nach Depolarisierung auf -4mV von 0.25 ± 0.21 gemessen, normalisiert auf die initiale Maximalkontraktion (n=5).

Nach 60 Sekunden Expositionszeit wurde keine entwickelte Kraft mehr nach Depolarisierung auf -4mV gemessen (n=6).

In der Serie des folgenden Protokolls wurden die Arterienringe auf -22mV depolarisiert, um eine Maximalkontraktion zu erreichen. Danach wurden die Arterienringe für 120 Sekunden mit Radikalen behandelt. Die entwickelte Kraft nach Radikalexposition übertraf die maximale Kraftentwicklung nach

Depolarisierung auf -4mV ($3.4 \pm 0.6 \text{ mN}$ vs. $4.0 \pm 0.7 \text{ mN}$; $P=0.04$; $n=15$; Abb. 6)

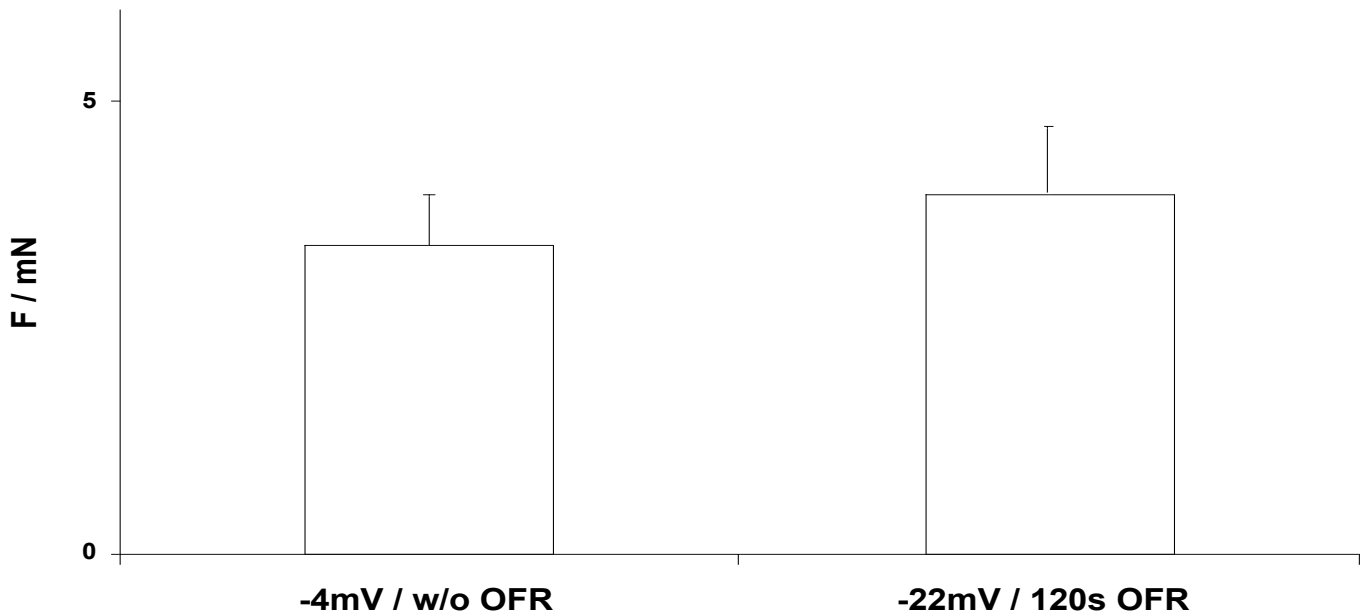


Abb. 6 Entwickelte Kraft unter Depolarisierung und unter 120s Radikalwirkung

Die folgenden Kontrollexperimente wurden mit Zugabe des antioxidativ wirkenden Scavengers Pyruvat durchgeführt. Dabei wurde eine Gruppe von Ziliararterien mit Zugabe von Pyruvat mit Radikalen behandelt und die andere Gruppe als Kontrollgruppe nur mit Radikalen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die relative Zunahme des Gefäßtonus' unter Radikalwirkung bei Anwesenheit von Pyruvat signifikant geringer war, als bei Abwesenheit von Pyruvat (Abb. 7)

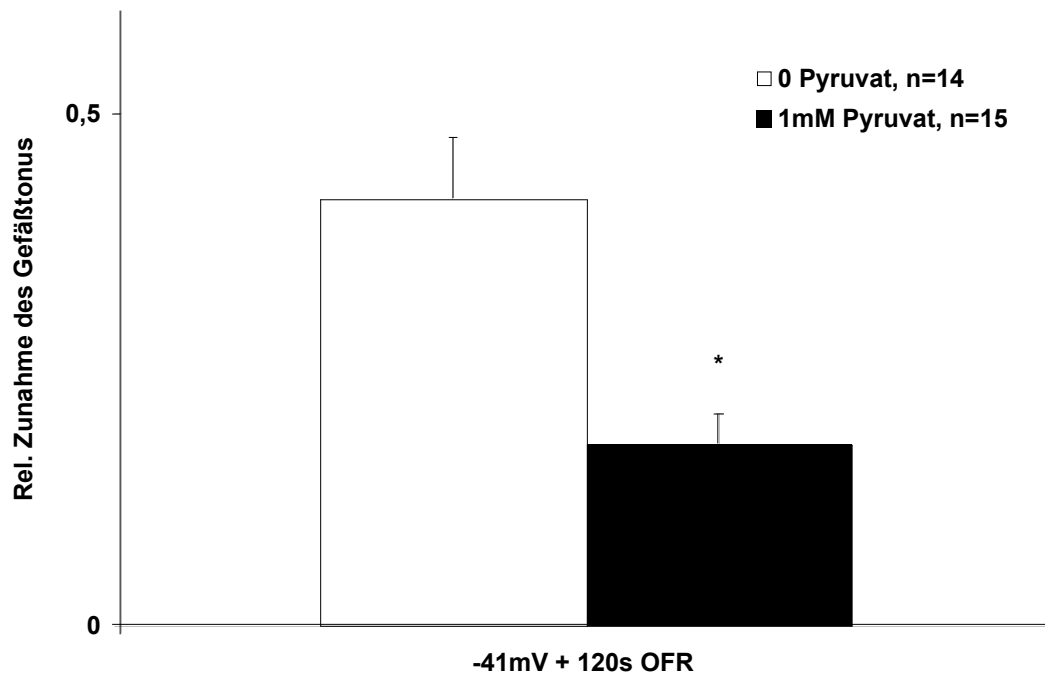


Abb. 7 Radikalwirkung auf den Gefäßtonus ohne und mit Pyruvatzugabe

In Abwesenheit von Pyruvat führt eine zweiminütige Exposition der Präparate gegenüber Hydroxylradikalen zu einem Anstieg des Gefäßtonus' auf 42 ± 7 % des Ausgangswertes (n=14). Pyruvatzusatz vermindert diesen Anstieg auf 18 ± 3 % (n=15). Der Effekt von Pyruvat ist statistisch signifikant (P=0.003).

4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass freie Radikale eine Vasokonstriktion bei isolierten Arterienringen der Ziliararterie vom Schwein induzieren. Es konnte bei unterschiedlichen Expositionszeiten eine signifikante Tonuserhöhung beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Arbeiten, die ebenfalls einen Anstieg des Gefäßtonus' unter Radikalwirkung an Arterien anderer Versorgungsgebiete zeigen konnten (Auch-Schwelk et al, 1989; Rhoades et al, 1990; Veriac et al, 1993; Wiklund et al, 1996). Die Erhöhung des Tonus' des Arterienringes durch Behandlung mit freien Radikalen war transient und reversibel. Der Effekt weist damit grundsätzliche Parallelen zu dem klinischen Phänomen eines Vasospasmus auf (Gasser, 1991). Es gibt bisher kaum Informationen über derartige Prozesse am Auge, lediglich ein Autor beschrieb Ähnliches über die Wirkung an der Netzhaut von Kaninchen. Es konnte dabei in einem *in vivo*-Experiment gezeigt werden, dass oxidativer Stress in einem Ischämie-Reperfusion-Modell Vasokonstrictionen auslöste (Tezel, 2006). Möglicherweise könnte das jetzt etablierte Setup als Vasospasmusmodell für die Wirkung von oxidativem Stress auf Gefäße des Auges hilfreich sein.

Im Rahmen der Experimente waren zwei Beobachtungen besonders interessant. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die zeitliche Exposition mit Radikalen mit der erneuten Aktivierbarkeit des Gefäßes korrelierte. So war es möglich, nach einer Expositionszeit von zehn Sekunden das Gefäß zu relaxieren und erneut zu depolarisieren. Nach 20 Sekunden Radikalexposition konnte eine noch moderate Kraftentwicklung nach erneuter Depolarisierung gemessen werden, aber nach einer Expositionszeit von 60 Sekunden war keine Kraftentwicklung mehr messbar. Das Gefäß war nach dieser Expositionsdauer nicht mehr zu depolarisieren. Es scheint eine von der Expositionszeit abhängige, radikalinduzierte Schädigung des Gefäßes einzutreten. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass eine Radikalexposition die Kraftentwicklung über das Ausgangsniveau der Vollaktivierung steigern kann. Dies spricht möglicherweise für eine Schädigung der Myofilamente und folglich veränderte Kalzium-Empfindlichkeit. Die aufgeführten Veränderungen sind so noch nicht beschrieben worden. Es gibt Überlegungen, welche sich grundsätzlich mit der Frage beschäftigen, warum der Vasotonus unter Radikalwirkung zunimmt.

Einige Autoren vermuten, dass reaktive Sauerstoffradikale mit NO-Radikalen interagieren und somit einen wichtigen Vasodilatator neutralisieren. Dieser Mechanismus resultiert demzufolge in einem Überwiegen der Vasokonstriktoren. Man konnte zum Beispiel bei Patienten mit akutem Tinnitus hohe Radikal-Plasmaspiegel und niedrige NO-Plasmaspiegel messen, was für eine NO-Neutralisation sprechen würde (Aladag et al, 2006; Neri et al, 2006). Jedoch stellt sich die Frage, ob die beschriebene Beobachtung durch diese Überlegung befriedigend erklärt wird. Im Rahmen der Versuche konnte gezeigt werden, dass die Gefäßkontraktion nach Radikalexposition höher war als die Kontraktion nach maximaler Depolarisierung (Abb. 6). Somit scheint eine Erklärung dieser Beobachtung durch eine Neutralisation der Vasodilatoren nicht ausreichend zu sein. Ein anderer Ansatzpunkt ist, dass freie Radikale, direkt oder indirekt, mit Zellstrukturen wie Kalziumkanälen oder anderen Kanälen, an der Zellmembran oder dem sarkoplasmatischen Retikulum interagieren. Bei neuronalem und myokardialem Gewebe ist bereits beschrieben worden, dass es nach oxidativem Stress zu einem erhöhten Kalziumeinstrom kommt (Ray et al, 2000; Zeitz et al, 2002). Möglicherweise ist dies auch auf Ziliararterien übertragbar. Die durchgeführten Experimente geben darüber hinaus einen Hinweis darauf, dass neben dem Effekt auf den Kalziumeinstrom auch ein Effekt auf die Kalziumempfindlichkeit der Myofilamente existiert. Dafür würde die oben beschriebene Beobachtung sprechen, dass die Gefäßkontraktion nach Radikalexposition höher war, als die Kontraktion nach maximaler Depolarisierung (Abb. 6). Die zugrunde liegende Annahme hierbei ist, dass der Kalzium-Einstrom bei -4mV maximal ist. Dies unterstützt die Vermutung, dass freie Radikale den Kalziumeinstrom und die Kalziumempfindlichkeit von Gefäßzellen beeinflussen können.

In einem Kontrollexperiment ist es gelungen, unter Zugabe von 1mM Pyruvat, die Wirkung der Radikale auf den Gefäßtonus zu vermindern. Dabei konnte beobachtet werden, dass die relative Zunahme des Gefäßtonus' unter Radikalwirkung bei Anwesenheit des Scavengers Pyruvat signifikant geringer war, als bei Abwesenheit von Pyruvat (Abb. 7). Es konnte somit gezeigt werden, dass sich der Effekt der freien Sauerstoffradikale durch Zugabe eines Scavengers größtenteils blocken lässt. Dies spricht dafür, dass es sich tatsächlich um einen durch freie Sauerstoffradikale induzierten Effekt handelt.

Die Studie wird durch verschiedene Faktoren limitiert. So ist neben der Manipulation an der Ziliararterie selber und der daraus resultierenden möglichen Beeinflussung der Kontraktionsfähigkeit der Gefäßzelle vor allem die Interaktion des glatten Muskelgewebes mit den verschiedenen chemischen Reagenzien zu nennen. Zum Beispiel erfolgte die Applikation von BDM unter der Vorstellung, dass es am ziliaren Gewebe ähnlich wirkt wie am Herzmuskelgewebe. Für dieses ist eine protektive Wirkung beschrieben, aber diese Untersuchung fehlt für die Gefäßmuskulatur des Auges. Daneben ist auch die Applikation des Scavengers Pyruvat zu nennen, welches als Radikalfänger unlängst bekannt ist, jedoch möglicherweise auch eine eigene Wirkkomponente auf den Muskeltonus besitzt. Auch die Interaktion der freien Sauerstoffradikale mit dem Gefäßmuskel ist nach wie vor unverstanden und lässt nur eine relativ begrenzte Aussage zu.

4.1 Klinische Bezüge

Klinische Beobachtungen aus anderen medizinischen Fachgebieten stehen im Einklang mit der Annahme, dass oxidativer Stress im direkten Zusammenhang mit Vasokonstriktionen stehen kann. Vasospasmen nach Subarachnoidalblutungen können Folge einer Akkumulation von freien Radikalen sein (Clark and Sharp, 2006). Vasospasmen auf und sind bekannt als eine schwerwiegende Komplikation, die mit einer hohen Mortalität einhergeht. Applizierte Scavenger konnten aber die Wirkung der Radikale nach Subarachnoidalblutungen abmildern (Aladag et al, 2006).

Bei Patienten mit primärem, chronischem Offenwinkelglaukom gibt es ebenfalls Anzeichen dafür, dass oxidativer Stress in die Pathophysiologie der Erkrankung involviert ist. Bei Patienten, bei denen eine filtrierende Operation durchgeführt wurde, konnte Gewebe vom Trabekelwerk gewonnen werden. In den untersuchten Proben wurde nachgewiesen, dass vermehrt DNA durch oxidativen Stress geschädigt worden war (Sacca et al, 2005). Es stellt sich die Frage, warum es trotz der Abwehrmechanismen des Körpers zu dieser Schädigung kommen kann. Vor allem scheint ein gestörtes Gleichgewicht zwischen oxidativer Schädigung und Abwehrmechanismus wichtig zu sein. Dafür gibt es mehrere Hinweise. Gherghel wies bei Glaukompatienten einen erniedrigten Gluthathion-Spiegel im Plasma nach (Gherghel et al, 2005). Diese erniedrigten Spiegel könnten auf eine erhöhte Anfälligkeit bei oxidativer Schädigung hinweisen. Die Studie von Ferreira konnte

zeigen, dass das antioxidative Potential von Glaukompatienten erniedrigt war und bei 60-70% des normalen Niveaus lag, obwohl die Aktivität der antioxidativ wirksamen Enzyme im selben Umfang erhöht war (Ferreira et al, 2004). Das deutet darauf hin, dass die verminderte Fähigkeit zur Abwehr von oxidativem Stress eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Glaukoms spielt.

Tierexperimente unterstützten diese klinischen Daten und weisen mehr noch auf eine Verbindung von oxidativem Stress und einem erhöhtem intraokularem Druck hin. Kurz nach dem experimentellen Herbeiführen einer okulären Hypertension konnte man das Ansteigen von Lipidperoxidationen und eine beginnende Aktivitätssteigerung von antioxidativen Enzymen beobachten (Ko et al, 2005). Einige dieser Parameter kehrten nach länger andauernder Hypertension zu ihrem Ausgangswert zurück. Dies könnte bedeuten, dass ein verändertes oxidatives Gleichgewicht bereits in frühen Stadien des Glaukoms eine Rolle spielt. Diese Beobachtung wird durch weitere Studien unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass in länger andauernden okulären Hypertensionen antioxidative Schutzmechanismen vermindert waren (Gherghel et al, 2005; Moreno et al, 2004). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Tinnitus-Patienten gefunden (Neri et al, 2006). Auch beim Raynaud-Syndrom scheint oxidativer Stress an der Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt zu sein (Cooke and Marshall, 2005). Das bestärkt die Vermutung, dass den verschiedenen Erkrankungen zumindest eine gemeinsame Komponente der Pathophysiologie zugrunde liegt.

Durch die aufgeführten Anhaltspunkte scheint die Bedeutung von oxidativem Stress und dem gestörten Verhältnis zwischen oxidativem Stress und Schutzmechanismus größer zu sein, als bisher angenommen. Es erscheint erforderlich, diese bisher wenig untersuchten Zusammenhänge in weiteren Studien zu klären.

4.2 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen aus der Sichtweise des Autors zu zwei wichtigen Schlussfolgerungen. Es lässt sich anhand der Daten beschreiben, dass oxidativer Stress den Gefäßtonus von Ziliararterien nachteilig beeinflussen kann. Das könnte bedeuten, dass freie Sauerstoffradikale in der Lage sind, einen Pathogenesefaktor des primären chronischen Offenwinkelglaukoms zu

begünstigen: eine Veränderung der Hämodynamik. Oxidativer Stress ist somit als möglicher Mediator der glaukomatösen Optikusneuropathie anzusehen.

Außerdem verursacht oxidativer Stress eine kurzfristige Störung der Gefäßregulation mit Anstieg des Gefäßtonus', welcher Ähnlichkeit mit einem Vasospasmus besitzt. Die daraus resultierende verminderte Durchblutung könnte eine nachteilige Versorgung des Gewebes zur Folge haben.

Das hier etablierte *in vitro*-System könnte als Vasospasmusmodell dienen und für weitere physiologische oder pharmakologische Experimente genutzt werden. Dies könnte auch für Erkrankungen mit ähnlich bedingtem Hintergrund wie Migräne, Tinnitus oder der Raynaud-Erkrankung sinnvoll sein.

5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung des Normaldruckglaukoms spielt eine Fehlregulation des Gefäßtonus' und eine verminderte Durchblutung eine möglicherweise entscheidende pathophysiologische Rolle. Es gibt Hinweise darauf, dass Glaukompatienten vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Vermutung ist, dass oxidativer Stress und freie Sauerstoffradikale den Gefäßtonus erhöhen und somit die Durchblutung negativ beeinflussen können. Die Versuche wurden an Ringpräparaten der hinteren Ziliararterien aus Schweineaugen von Schlachtvieh durchgeführt. Die Präparate wurden in ein hierfür konstruiertes Kraft-Mess-System eingebracht und unter physiologischen Bedingungen mit Radikalen behandelt. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass freie Sauerstoffradikale den Tonus von Ziliararterien beeinflussen. Die Exposition mit freien Sauerstoffradikalen erfolgte dabei in unterschiedlichen Radikal-Zeit-Dosen (10s, 20s, 60s). In allen drei Gruppen wurden vergleichbare, transiente und reversible Kontraktionen beobachtet (Abb. 5). Sie weisen somit Parallelen zu Vasospasmen auf. Die Annahme, dass Radikale zu Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur führen, konnte somit bestätigt werden. Der in einem Kontrollexperiment zugefügte Scavenger Pyruvat konnte die Wirkung der Radikale vermindern, was dafür spricht, dass es sich tatsächlich um einen durch Radikale vermittelten Effekt handelt. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass nach Radikalexposition stärkere Gefäß-

kontraktion auslösbar waren, als durch maximalen Kalziumeinstrom durch Volldepolarisierung mit Kalium (Abb. 6). Dies könnte, neben der vorher beschriebenen Wirkung der Radikale auf den Kalziumeinstrom in die Muskelzelle, auch auf eine durch Radikale veränderte Kalziumempfindlichkeit der Myofilamente hinweisen.

6. Literaturverzeichnis

Aladag MA, Turkoz Y, Ozcan C, Sahna E, Parlakpinar H, Akpolat N, Cigremis Y (2006) Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage by increasing brain nitric oxide levels. *Int J Dev Neurosci* 24:9-14

Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM (1989) Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 13:859-864

Cadenas E (1989) Biochemistry of Oxygen Toxicity *Annu Rev Biochem* 58:79-111

Calabrese V, Lodi R, Tonon C, D'Agata V, Sapienza M, Scapagnini G, Mangia A, Pennisi G, Stella AM, Butterfield DA (2005) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci* 15:145-162

Clark JF, Sharp FR (2006) Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1223-1233

Cooke JP, Marshall JM (2005) Mechanisms of Raynaud's disease. *Vasc Med* 10:293-307

Davies KJ (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defences: an hypothesis. *J Free Radic Biol Med* 2:155-173

Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM (2006) Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 34:960-964

Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Alfieri O, Pardini A, Marzollo P, Visioli O (1991) Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents Symposium on Oxidants and Antioxidants. *Am J Med* 91:95-105

Ferreira SM, Lerner SF, Brunzini R, Evelson PA, Llesuy SF (2004) Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am J Ophthalmol* 137:62-69

Flammer J, Pache M, Resink T (2001) Vasospasm, its role in the pathogenesis of diseases with particular reference to the eye. *Prog Retin Eye Res* 20:319-349

Flammer J, Orgul S, Costa VP, Orzalesi N, Krieglstein GK, Serra LM, Renard JP, Stefansson E (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 21:359-393

Fleming I (2001) Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res* 26:753-762

Galambos P, Vafiadis J, Vilchez SE, Wagenfeld L, Matthiessen ET, Richard G, Klemm M, Zeitz O (2006) Compromised autoregulatory control of ocular hemodynamics in glaucoma patients after postural change. *Ophthalmol* 113:1832-1836

Galassi F, Sodi A, Ucci F, Renieri G, Pieri B, Baccini M (2003) Ocular hemodynamics and glaucoma prognosis: a color Doppler imaging study. *Arch Ophthalmol* 121:1711-1715

Gasser P (1991) Clinical syndromes with vasoconstrictor response. *Wien Klin Wochenschr* 103:217-221

Gherghel D, Orgul S, Gugleta K, Gekkieva M, Flammer J (2001) Relationship between ocular perfusion pressure and retrobulbar blood flow in patients with glaucoma with progressive damage. *Am J Ophthalmol* 132:598-599

Gherghel D, Hosking SL, Cunliffe IA (2004) Abnormal systemic and ocular vascular response to temperature provocation in primary open-angle glaucoma patients: a case for autonomic failure? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3546-3554

Gherghel D, Griffiths HR, Hilton EJ, Cunliffe IA, Hosking SL (2005) Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:877-883

Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A (2006) Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 27:924-932

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29:345-350

Haufroid Y, Collignon-Robe NJ (2004) Ocular vasospastic syndrome. *Rev Med Liege* 59:227-231

Jackson MJ, Pye D, Palomero J (2007) The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102:1664-1670

Jarajapu YP, Grant MB, Knot HJ. (2004) Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:253-259

Jayawant AM, Stephenson ER Jr, Damiano RJ Jr. (1999) 2,3-Butanedione monoxime cardioplegia: advantages over hyperkalemia in blood-perfused isolated hearts. *Ann Thorac Surg* 67:618-623

Kim IS, Moon HY, Yun HS, Jin I (2006) Heat Shock Causes Oxidative Stress and Induces a Variety of Cell Rescue Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol* 44:492-501

Ko ML, Peng PH, Ma MC, Ritch R, Chen CF (2005) Dynamic changes in reactive oxygen species and antioxidant levels in retinas in experimental glaucoma. *Free Radic Biol Med* 39:365-73

Kode A, Yang SR, Rahman I. (2006) Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res.* 24;7(1):132

Martus P, Stroux A, Budde WM, Mardin CY, Korth M, Jonas JB (2005) Predictive factors for progressive optic nerve damage in various types of chronic open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol.* ;139(6):999-1009

Mombouli JV, Vanhoutte PM (1999) Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31(1):61-74.

Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F, Klugbauer N. (2003) Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation.. *EMBO J.* 17;22(22):6027-34.

Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sanz DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE (2004) Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med* 37:803-12

Neri S, Signorelli S, Pulvirenti D, Mauceri B, Cilio D, Bordonaro F, Abate G, Interlandi D, Misseri M, Ignaccolo L, Savastano M, Azzolina R, Grillo C, Messina A, Serra A, Tsami A (2006) Oxidative stress, nitric oxide, endothelial dysfunction and tinnitus. *Free Radic Res* 40:615-8

Pereda J, Sabater L, Aparisi L, Escobar J (2006) Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Curr Med Chem.*; 13(23):2775-87

Prunte C, Orgul S, Flammer J (1998) Abnormalities of microcirculation in glaucoma: facts and hints. *Curr Opin Ophthalmol.*;9(2):50-5

Ray SK, Fidan M, Nowak MW, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL (2000) Oxidative stress and Ca²⁺ influx upregulate calpain and induce apoptosis in PC12 cells. *Brain Res* 852:326-34

Ray R, Shah AM (2005) NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci* 109(3):217-26.

Rhoades RA, Packer CS, Roepke DA, Jin N, Meiss RA (1990) Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 68:1581-9

Sacca SC, Pascotto A, Camicione P, Capris P, Izzotti A (2005) Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 123:458-63

Schmidt R, Lang F (2007) Kontraktionsmechanismen. In: *Physiologie des Menschen Schmidt/Lang* (Hrsg) Springer Verlag Heidelberg Berlin New York (Lehrbuch der Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 30. überarbeitete Auflage S.111-139)

Schumann J, Orgul S, Gugleta K (2000) Interocular difference in progression of glaucoma correlates with interocular differences in retrobulbar circulation. *Am J Ophthalmol*. 129:728-33

Sen S, Phillis JW Free (1993)alpha-Phenyl-tert-butyl-nitron (PBN) attenuates hydroxyl radical production during ischemia-reperfusion injury of rat brain: an EPR study. *Radic Res Commun.*;19(4):255-65

Severi T, Ying C, Vermeesch JR, Cassiman D, Cnops L, Verslype C, Fevery J, Arckens L, Neyts J, van Pelt JF (2006) Hepatitis B virus replication causes oxidative stress in HepAD38 liver cells. *Mol Cell Biochem.*;290(1-2):79-85

Silbernagel S, Klinke R (2001) Ionenpumpen. In: Physiologie Silbernagel (Hrsg) Thieme, Stuttgart Berlin Düsseldorf New York (Lehrbuch der Physiologie, 3. überarb. Aufl. S. 21)

Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, Singh K (1991) Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. Arch Ophthalmol. 109(8):1090-5

Tezel G (2006) Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. Prog Retin Eye Res 25:490-513

Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation Toxicology. 15;189(1-2):41-54.

Vahl CF, Bonz A, Hagl C, Timek T, Herold U, Fuchs H, Kochsiek N, Hagl S (1995) Cardioplegia on the contractile apparatus level: evaluation of a new concept for myocardial preservation in perfused pig hearts. Thorac Cardiovasc Surg. 43(4):185-93

Vergely C (2001) Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury: cardiovascular effects of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. Free Radic Res. 35(5):475-89

Veriac S, Tissie G, Bonne C (1993) Oxygen free radicals adversely affect the regulation of vascular tone by nitric oxide in the rabbit retina under high intraocular pressure. Exp Eye Res 56:85-8

Wiklund L, McGregor CG, Miller VM (1996) Effects of prolonged exposure to oxygen-derived free radicals in canine pulmonary arteries. Am J Physiol 270:H2184-90

Yamagishi S, Ueda S, Matsui T, Nakamura K, Okuda S (2008) Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 14(10):962-8

Yamazaki Y, Drance SM. (1997)The relationship between progression of visual field defects and retrobulbar circulation in patients with glaucoma. *Am J Ophthalmology*;124:287-295

Zeitz O, Maass AE, Van Nguyen P, Hensmann G, Kogler H, Moller K, Hasenfuss G, Janssen PM (2002) Hydroxyl radical-induced acute diastolic dysfunction is due to calcium overload via reverse-mode Na(+)-Ca(2+) exchange. *Circ Res* 90:988-95

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Zeitz und Herrn Dr. Wagenfeld für die hervorragende Betreuung. Sie waren eine große Hilfe und haben sich stets um meine Anliegen gekümmert. Nur Ihnen habe ich es zu verdanken, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form entstehen konnte. Ich danke Ihnen außerdem dafür, mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt zu haben und mich mit wertvollen Ratschlägen auf zukünftige Projekte vorbereitet zu haben.

Ich danke außerdem den Mitgliedern der Glaukomforschungsgruppe, die mit vielen Diskussionen und Gesprächen eine große Hilfe waren.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Prof. Klemm, die mir großes Vertrauen entgegenbrachte und mir dieses interessante Thema überließ.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: