

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

Die Rolle von Midkine in der Pathophysiologie des Glaukoms

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Carl Axel von Netzer
aus Bonn

promoviert am 08. Mai 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. R. Hörster
2. Gutachter: Professor Dr. med. C. Lüke

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten

Herr PD Dr. Robert Hörster (Themenauswahl, Probenentnahme, Statistische Auswertung)
Frau Heinke von Netzer (Korrekturlesen)
Herr Dario Zocholl (Statistische Beratung)

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz wurde aus einer von mir entwickelten Datenbank entnommen. Diese Datenbank wurde von mir und zwei weiteren Doktoranden mit bereits erhobenen Daten aus dem Praxis Programm „Duria“ gespeist. Diese Daten waren bereits im Vorfeld durch Mitarbeiter des AugenCentrums Erkelenz erhoben worden. Insgesamt wurden von mir und den zwei weiteren Doktoranden 1000 Patienten mit je 72 Datenpunkten aus dem Praxis Programm „Duria“ in die Datenbank eingepflegt und für weitere Untersuchungen statistisch auswertbar gemacht.

Die intraoperative Probenentnahme, der Vorderkammerflüssigkeit, welche im weiteren Verlauf auf Konzentrationen des Zytokin Midkine untersucht werden sollte, wurde durch operativ tätige Kollegen des AugenCentrums Erkelenz durchgeführt. Der größte Anteil dieser entnommenen Proben entfiel dabei auf PD Dr. Robert Hörster.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse, der Midkine-Werte in der Vorderkammerflüssigkeit wurden ohne meine Mitarbeit fachgerecht durch medizinisch-technischen Assistenten des Labors der Klinik für Hämatologie/Onkologie der Universitätsklinik Erlangen unter Leitung von Professor Jacobus Bosch ermittelt.

Die statistische Auswertung der erhobenen Midkine Konzentrationen in der Vorderkammerflüssigkeit inklusive Erstellung einiger Grafiken wurde durch PD Dr. Robert Hörster unter Zuhilfenahme des Statistik Programms Prism von der Firma Graphpad durchgeführt.

Eine Analyse der Patientencharakteristika bei Baseline mit Erstellung von Dotplots zur Veranschaulichung wurde durch mich erarbeitet.

Die immunhistochemische Färbung und der Mikroskopische Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes wurde durch medizinisch-technische Assistenten des Labors für Ophthalmopathologie (Priv.-Doz. Dr. Konrad R. Koch) angefertigt.

Das Heraussuchen und die Zusammenfassung der Literatur des gegenwärtigen Forschungsstandes von sowohl der Erkrankung des Glaukoms als auch dem Zytokin Midkine wurden ausschließlich durch mich durchgeführt. Dazu wurden ebenfalls durch mich Grafiken erstellt, welche die dargestellten Sachverhalte veranschaulichen. Die gesamte Anfertigung dieser Arbeit aus den beschriebenen vorliegenden Ergebnissen wurde durch mich absolviert.

Um die Lesbarkeit dieser Arbeit zu erleichtern, wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher, weiblicher und anderer geschlechtlicher Formen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten jedoch selbstverständlich gleichermaßen für alle Geschlechter.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 10.09.2025

Unterschrift:

Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit war nur möglich, da eine Vielzahl von Freunden und Familie hinter mir standen und mich begleitet und motiviert haben.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. Robert Hörster danken, der die Untersuchung überhaupt erst ermöglicht hat. Seine wertvollen Anregungen, seine Expertise und seine unerschütterliche Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater und Heinke, ohne die ich die Arbeit nicht hätte beginnen können und die mir stets für Fragen, Motivation und Korrekturen zur Seite standen. Eure ständige Ermutigung und euer Vertrauen in mich waren von unschätzbarem Wert.

Herzlich danke ich meiner Mutter, die immer für mich da war und mich in schwierigen Momenten zur Seite gestanden hat. Deine ständige Zuversicht und liebevolle Begleitung haben mir viel Kraft gegeben.

Ein riesiges Dankeschön richte ich an meine Freundin Quynh Nhi, die mich am meisten angetrieben hat und mir die Zeit zum Schreiben gegeben hat. Deine unermüdliche Hilfe und Geduld haben mir ermöglicht, diese Arbeit zu vollenden.

Mein Dank gilt auch dem Rest meiner Familie: David, Eva, Martha und Arthur. Ihr standet immer hinter mir und habt mich bestärkt, meinen Weg konsequent weiterzugehen.

Ein weiteres herzliches Dankeschön an Heidi, die mich stets angespornt hat und als gutes Beispiel einer kürzlich abgeschlossenen Arbeit ein großes Vorbild für mich war.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei Dario Zocholl für die tolle statistische Beratung. Außerdem war auch Dario ein gutes Vorbild einer kürzlich abgeschlossenen Dissertation.

Ohne Euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr habt mich inspiriert, gestärkt und mich dazu gebracht meine Arbeit abzuschließen. Dafür bin ich Euch unendlich dankbar!

Widmung

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	10
2. EINLEITUNG	11
2.1. Anatomie und Physiologie des Auges	11
2.2. Das Glaukom	15
2.2.1. Definition des Glaukoms	15
2.2.2. Formen des Glaukoms	16
2.2.3. Epidemiologie	17
2.2.4. Mechanismen des Glaukoms	18
2.2.5. Ursachen und Risikofaktoren für das Glaukom	19
2.2.5.1. Der Augeninnendruck	19
2.2.5.2. Ethnizität	20
2.2.5.3. Alter	20
2.2.5.4. Familienanamnese	20
2.2.5.5. Genetische Marker	21
2.2.5.6. Diabetes	21
2.2.5.7. Kurzsichtigkeit	21
2.2.5.8. Papillenmorphologie	22
2.2.5.9. Transforming Growth Factor beta (TGF- β)	22
2.3. Das Zytokin Midkine	23
2.3.1. Allgemeine Beschreibung und Geschichte	23
2.3.2. Midkine als Diagnostischer Marker	24
2.3.3. Midkine Zusammenhang Entzündung	25
2.3.4. Midkine im Zusammenhang mit Transforming Growth Factor beta (TGF- β) und der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT)	26
2.3.5. Midkine und Midkine-Inhibitoren als Behandlung	26
2.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit	27
3. MATERIAL UND METHODEN	28
3.1. Material	28
3.1.1. Studiendesign und Einschlusskriterien	28
3.1.2. Probengewinnung	29

3.1.3.	Patientensubgruppen	29
3.1.4.	Primäres Offenwinkelglaukom	29
3.1.5.	Makulaödem	29
3.1.6.	Pseudoexfoliationssyndrom (PEX)	30
3.1.7.	Frühe - altersbedingte Makuladegeneration (frühe AMD)	30
3.1.8.	Späte - altersbedingte Makuladegeneration (späte AMD)	30
3.1.9.	Tamsulosineinnahme	30
3.2.	Methoden	31
3.2.1.	Statistische Analyse Verfahren	31
3.2.2.	Glaukom Diagnostik	32
3.2.3.	Gesichtsfeld Perimetrie	32
3.2.4.	Optische Kohärenztomographie (OCT)	32
3.2.5.	ELISA-Midkine-Analyse	33
3.2.6.	Immunhistochemische Färbung	34
4.	ERGEBNISSE	35
4.1.	Patientencharakteristika bei Baseline	35
4.2.	Midkine-Konzentrationen in Vorderkammerflüssigkeit	35
4.2.1.	Midkine-Spiegel unterschiedlicher okulärer Erkrankungen verglichen mit Kontrollpatienten	36
4.2.2.	Wiederholung der Analyse für Kontroll- und POWG- Patienten.	37
4.3.	Immunhistochemische Färbung und Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes	39
5.	DISKUSSION	41
5.1.	Allgemein	41
5.2.	Patientencharakteristika bei Baseline	41
5.3.	Midkine-Konzentrationen in Vorderkammerflüssigkeit	42
5.3.1.	Midkine-Spiegel unterschiedlicher okulärer Erkrankungen verglichen mit Kontrollpatienten	42
5.3.2.	Wiederholung der Analyse für Kontroll- und POWG- Patienten	43
5.4.	Immunhistochemische Färbung und Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes	44
5.5.	Midkine und TGF- β in der Pathophysiologie des Glaukoms	45

5.6.	Mögliche Interpretationen der Ergebnisse – Herkunft des Zytokins Midkine	46
5.6.1.	Autokrine-Midkine-Hypothese	47
5.6.2.	Begleitphänomen-Hypothese	49
5.6.3.	Fremd-Midkine-Hypothese	50
5.6.4.	“Henne-Ei-Problematik”	51
5.7.	Midkine als Marker in der Diagnostik und zur Früherkennung des Glaukoms	52
5.8.	Midkine als Therapieziel in der Behandlung des Glaukoms	53
5.9.	Mögliche Schwächen und Limitationen der Dissertation	53
5.9.1.	Selektionsbias	54
5.9.2.	Messfehler	56
5.9.3.	Dropout	56
5.9.4.	Die Stichprobengröße	56
5.9.5.	Populationsvalidität	57
5.9.6.	Zeitliche Validität	58
5.9.7.	Situationsvalidität	58
5.10.	Ausblick auf weitere Forschung und weitere Untersuchungen	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	62
7.	ANHANG	71
7.1.	Abbildungsverzeichnis	71
7.2.	Beigefügte Materialien	72

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
CDR	Cup-Disk-Ratio
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelialen-Mesenchymalen Transition
FR	Fontana Räume
GZ	Ganglienzellen
HK	Hinterkammer
IR	Iris
JK	Juxtakanalikulargewebe
KE	Kontinuierliches Endothel der Innenwand des Kanals von Schlemm
KN	Kornea
KVS	Kanal von Schlemm
KW	Kammerwinkel
LS	Linse
MK	Midkine
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druck) $\triangleq$ 133,322 Pa
mRNA	Messenger RNA. Auch Boten-Ribonukleinsäure.
NH	Netzhaut
NPE	Nichtpigmentierte Epithelzellen
OCT	Optische Kohärenztomographie (optical coherence tomography)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEX	Pseudoexfoliationssyndrom
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
PP	Pupille
PTN	Zytokin Pleiotrophin
QQ-Plot	Quantil-Quantil-Plot (graphische Darstellung einer Normalverteilung)
RNA	Ribonukleinsäure
SCR	Suprachoroidalraum
SK	Sklera
SN	Sehnerv
St&Z	Stäbchen und Zapfen
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TM	Trabekelmaschenwerk
TRS	Target Retrieval Solution
VK	Vorderkammer
VP	Tiefer und mittlerer skleraler Venenplexus
ZK	Ziliarkörper

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gibt eine Perspektive auf die Pathophysiologie des Glaukoms, einer Erkrankung des Auges, die zur irreversiblen Erblindung der Patienten führen kann. Untersucht wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Konzentration des Zytokins Midkine im Kammerwasser des Auges und dem Vorliegen eines Glaukoms. Das Glaukom wird in den meisten Fällen auf einen erhöhten Augeninnendruck zurückgeführt. Dieser wird, der Theorie nach, durch einen verminderten Abfluss des Kammerwassers über das Trabekelmaschenwerk erzeugt, der dann – soweit die Vermutung – den Sehnerv schädigt und zur Glaukom-typischen Symptomatik führt. In einer Vielzahl der Fälle ist der Grund für den verminderten Abfluss über das Trabekel-Maschenwerk nicht ausreichend geklärt. Einige Faktoren und Zytokine wurden bereits in vorherigen Untersuchungen mit dem Glaukom in Verbindung gebracht, so auch der Transforming Growth Factor beta (TGF- β), der ebenfalls in Verbindung mit dem Zytokin Midkine steht. Vorliegend untersucht wurde die Midkine-Konzentration im Kammerwasser von Augen mit Glaukompatienten im Vergleich zu verschiedenen anderen Augenerkrankungen sowie gesunden Kontrollpatienten.

2. Einleitung

Das Glaukom war im Jahr 2020 mit insgesamt weltweit geschätzten 11,2 Millionen Patienten die zweithäufigste Ursache für irreversible Erblindungen.^[1,2] Die Erkrankung wurde bereits vor über tausend Jahren das erste Mal beschrieben^[3] und steht seitdem ununterbrochen im Fokus verschiedener Mediziner und Wissenschaftler.^[4–9] Trotzdem stellt die suffiziente Diagnose und Behandlung des Glaukoms bis heute eine Herausforderung dar.^[10,11] Während neuere Langzeitstudien bereits eine Halbierung unilateraler Erblindung verzeichnen konnten, konnte die Entwicklung von einseitiger und beidseitiger Blindheit in einem signifikanten Anteil behandelter Patienten trotz der verbesserten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten weiterhin nicht verhindert werden.^[8,12] Um den massiven Einbruch der Lebensqualität, der mit jedem einzelnen Erblindungsfall einhergeht abzuwenden, ist die Erforschung des bisher noch nicht vollständig geklärten Pathomechanismus des Glaukoms von großer Wichtigkeit. Dies könnte zu einer besseren Früherkennung und präziseren Therapien führen.

2.1. Anatomie und Physiologie des Auges

Zum einfacheren Verständnis des Glaukoms ist eine Verdeutlichung der Anatomie und Physiologie des Auges hilfreich. Die hier beschriebenen Strukturen sind mit den jeweils darauf folgenden Abkürzungen in Abbildung 1 zu sehen, welche schematisch die wichtigste Histoanatomie und Physiologie für das Glaukom beschreibt.

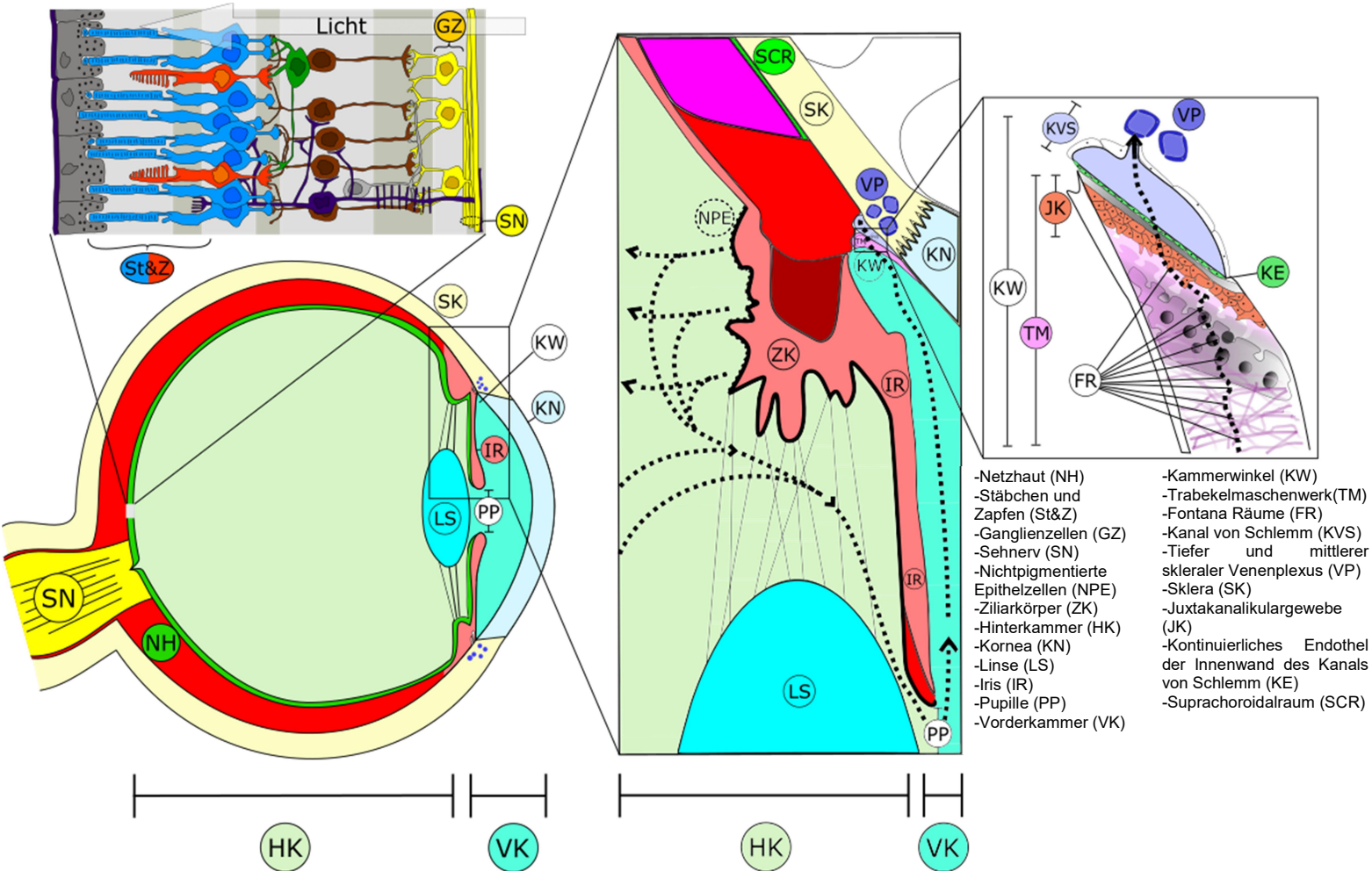
Auf der Netzhaut (NH) des Auges befinden sich neben den Stäbchen und Zapfen (St&Z), die für die Aufnahme von Licht verantwortlich sind, verschiedene Zellen, die diese gewonnenen Informationen verarbeiten und weiterleiten.^[13] In dieser Kaskade an dritter Stelle finden sich die Ganglienzellen (GZ), die mit ihren Axonen den Sehnerv (SN) bilden, der wiederum die Informationen an den visuellen Cortex des Gehirns leitet.^[13] Das Glaukom ist eine Erkrankung, welche durch ein allmähliches Absterben dieser Ganglienzellen in der Retina gekennzeichnet ist und dadurch zu einer graduellen Erblindung der Patienten führt.^[12] Der wesentlichste Risikofaktor für das Glaukom ist die Erhöhung des Augeninnendrucks.^[12] Der Augeninnendruck ist definiert als der Druck des Kammerwassers, der auf der Augeninnenwand lastet und wird in Millimeter Quecksilber (mmHg) gemessen.^[12] Unter physiologischen Bedingungen sollte dieser Druck zwischen 7 und 21 mmHg liegen.^[14] Der Augeninnendruck ist dabei strukturell für die Integrität der Anatomie des Auges notwendig.^[12] Während ein zu hoher Druck der Hauptrisikofaktor für das Glaukom ist, kann ein zu geringer Druck über eine längere Zeit die Integrität des Auges beeinträchtigen und beispielsweise zu einer Ablösung der Netzhaut (NH) mit daraus folgender Erblindung führen.^[12] Die Höhe des Augeninnendrucks wird durch die konstante Produktion und das konstante Abfließen des Kammerwassers reguliert.^[13,15] Pro Minute werden circa 2-3 Mikroliter des Kammerwassers

durch die nichtpigmentierten Epithelzellen (NPE) des Ziliarkörpers (ZK) mit aktiven Transportprozessen unter Zuhilfenahme von ATP produziert und in die Hinterkammer (HK) des Auges sekretiert.^[12] Die Zusammensetzung ähnelt dabei mit wenigen Unterschieden dem proteinfreien Anteil des Blutplasmas. Dabei enthält es lediglich 0,1% Protein (während es im Blutplasma circa 7% sind).^[12,13] Das Kammerwasser sichert neben der strukturellen Funktion des Augeninnendrucks die Versorgung mit Nährstoffen der avaskulären Strukturen des Auges, insbesondere der Kornea (KN) und der Linse (LS).^[12,16] Der stetigen Produktion des Kammerwassers steht ein stetiger Abfluss aus dem Auge entgegen.^[13] Dieser erfolgt über zwei verschiedene Wege, dem trabekulären und dem uveoskleralen Abfluss.^[12] Der trabekuläre wird dabei mit zwischen 50–75% als der primäre und hauptsächlich druckabhängige Weg und der uveosklerale mit 25–50% als der sekundäre und größtenteils druckunabhängige Weg bezeichnet, obwohl die Druckabhängigkeit beziehungsweise Druckunabhängigkeit dieser Wege nicht als absolut anzusehen ist.^[12,17,18] Während in jüngerem Alter der Abfluss noch anteilig zu jeweils 50% über den trabekulären sowie uveoskleralen Weg stattfindet, steigt der prozentuale Anteil des trabekulären Wegs zu Lasten des uveoskleralen mit zunehmendem Alter deutlich und das Kammerwasser fließt vermehrt über das Trabekelmaschenwerk ab.^[18] Da das Glaukom tendenziell eher in höherem Alter auftritt, wird davon ausgegangen, dass der trabekuläre Weg maßgeblich für den erhöhten Augeninnendruck bei Glaukompatienten verantwortlich ist.^[12]

Über den trabekulären Weg fließt das Kammerwasser aus der Hinterkammer (HK) zwischen der Linse (LS) und der Iris (IR) entlang durch die Pupille (PP) in die Vorderkammer (VK).^[13] In der Vorderkammer befindet sich im anatomischen Winkel zwischen der Kornea (KN) und der Iris (IR) (dem Iridokornealen Winkel oder auch Kammerwinkel (KW)) das Trabekelmaschenwerk (TM).^[13] Das Trabekelmaschenwerk ist ein engmaschiges Geflecht von bälkchenartigem Gewebe, das mit Endothelzellen ausgekleidet ist.^[19] Diese Bälkchen (Trabekel) bestehen aus feinem Bindegewebe, das hauptsächlich Kollagenfasern enthält.^[19] Durch die engen Zwischenräume zwischen diesen Bälkchen, welche als Fontana Räume (FR) bezeichnet werden, gelangt das Kammerwasser in den Kanal von Schlemm (KVS).^[13] Der Kanal von Schlemm, der zirkulär um die Kornea herum verläuft, leitet wiederum das Kammerwasser über den tiefen und den mittleren skleralen Venenplexus (VP) durch die Sklera (SK), an den episkleralen Venenplexus an der Außenseite der Sklera weiter.^[13] Auch die Kammerwasservenolen führen das Kammerwasser vom Kanal von Schlemm an die Außenseite des Auges.^[13] Von dort wird das Kammerwasser über die episkleralen und konjunktivalen Venen in das venöse System und damit in den Blutkreislauf zurückgeführt.^[13] Es wird angenommen, dass der Hauptort des Kammerwasserabflusswiderstandes dieses Weges im (Engl.: juxtacanalicular tissue) Juxtakanalikulargewebe (JK) und der inneren Wand des Kanals von Schlemm zu finden ist.^[12] Das Juxtakanalikulargewebe ist dabei der

Anteil des Trabekelmaschenwerkes, welcher direkt das kontinuierliche Endothel der Innenwand des Kanals von Schlemm (KE) überzieht.^[18] Es besteht aus mehreren, für Kammerwasser schwer zu passierenden, Endothelzellschichten, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind und erzeugt beziehungsweise reguliert den Kammerwasserabflusswiderstand in synergistischer Zusammenarbeit mit der Innenwand und der Basalmembran des Kanals von Schlemm.^[18,20] Der Widerstand der Innenwand des Kanals von Schlemm wird durch etwa 0,1-3 Mikrometer große Poren im kontinuierlichen Endothel verursacht.^[15] Es wird angenommen, dass die beschriebenen Zellen und Gewebe selbst ohne zentrale Steuerung in der Lage sind den intraokulären Druck zu bestimmen und den Abfluss des Kammerwassers zu regulieren.^[12] Eine Blockade des Abflusses über das Trabekelmaschenwerk mit einer Erhöhung des Augeninnendrucks gilt als wahrscheinlichster Kandidat für die Entstehung eines Glaukoms.^[12,17,18] In Untersuchungen des Juxtakanalikulargewebes von Spenderaugen mit primärem Offenwinkelglaukom mittels Elektronenmikroskopie findet sich häufig eine signifikante Zunahme von extrazellulärer Matrix und eine Anhäufung von bandartigen fibrillären Strukturen, die in unterschiedliche Glykoproteine eingebettet sind, welche als "Plaque-Material" beschrieben werden.^[21,22] Es konnte eine Korrelation zwischen abnehmender Axon-Anzahl im Nervus Opticus bei Glaukomerkrankung und der Menge des Plaque Materials im Juxtakanalikulargewebes festgestellt werden.^[21,23] Dabei scheint das Plaque Material jedoch eher ein Symptom als ein Grund des geringeren Kammerwasserabflusses von POWG Patienten zu sein, da Untersuchungen zeigen, dass Spenderaugen mit okulärer Hypertension oder Frühstadium Glaukom keine signifikanten Plaque Material Ablagerungen im Juxtakanalikulargewebe aufweisen.^[21,23] Nichtsdestotrotz scheint eine Veränderung im Trabekelmaschenwerk, spezifisch am Juxtakanalikulargewebe den Abfluss des Kammerwassers zu stören und maßgeblich mit den Schäden einer Glaukomerkrankung zusammenzuhängen.^[21] Über den uveoskleralen, druckunabhängigen Abflussweg fließt das Kammerwasser ebenfalls in die Vorderkammer, wo es dann durch die Zwischenräume zwischen den Muskelbündeln des Musculus ciliaris in den Suprachoroidalraum (SCR) gelangt, aus dem es in das venöse System aufgenommen wird.^[12] Da der uveosklerale Abflussweg in der Entstehung des Glaukoms, der Vermutung nach, eher eine untergeordnete Rolle spielt, wird er in dieser Arbeit nicht weiter behandelt.

Die Rolle von Midkine in der Pathophysiologie des Glaukoms Einleitung



2.2. Das Glaukom

2.2.1. Definition des Glaukoms

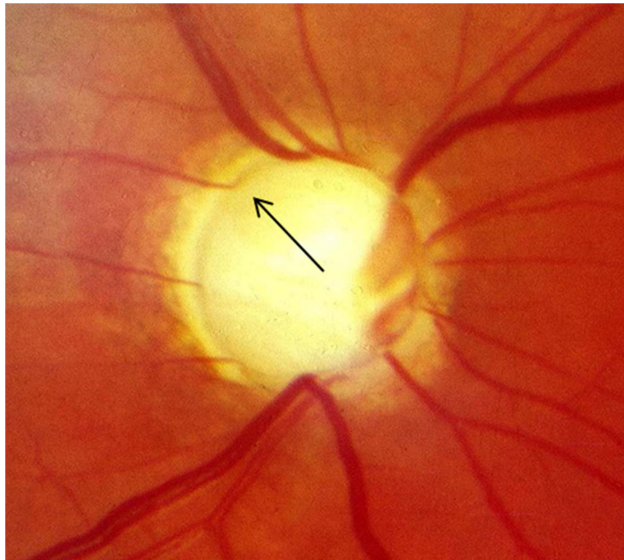


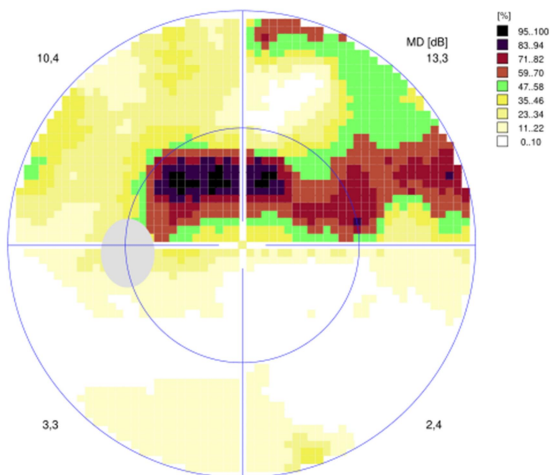
Abbildung 2 - „Fortgeschrittene Aushöhlung der Papille mit ‚bajonettartiger‘ Tiefenabknickung der Gefäße“^[125]

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glaukompapille2.jpg#/media/Datei:Glaukompapille2.jpg> (11.08.2019).

Das Glaukom ist eine multifaktorielle, progressiv-neurodegenerative Erkrankung der Augen, welche eine der häufigsten irreversiblen Erblindungsursachen weltweit darstellt.^[25]

In den European Glaucoma Society (EGS) Leitlinien vom Juli 2015 ist das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) als eine „chronische, progressive Optikusneuropathie mit charakteristischen morphologischen Veränderungen des Sehnervenkopfes und der retinalen Nervenfaserschicht“ definiert, bei der keine „andere[n] Augenerkrankungen oder kongenitale Anomalien vorliegen“.

Linkes Auge (OS) / 25.02.2014 / 12:24:22
Graustufe (CO)



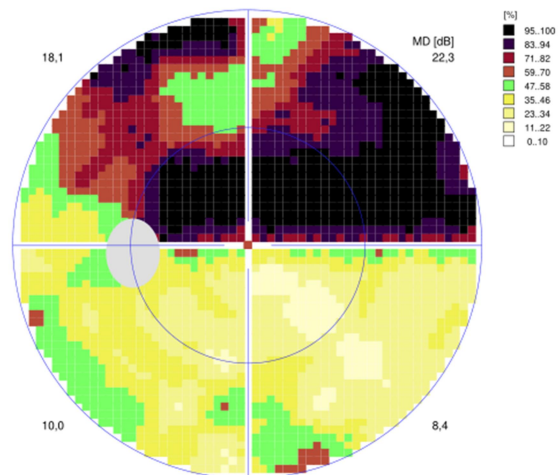
Programme: 32 Standard Weiss/Weiss / Dynamisch
Parameter: 31,4 / 4000 asb III 100 ms
Fangfragen: 0/9 (0%) +, 0/9 (0%) -
Refraktion S/Z/A:
Pupille [mm]:
NV: T12 V2.1

Stimuli/Wiederholungen: 181 / 0
Dauer: 06:12
RF:
VA:
IOP [mmHg]:

30°
MS [dB]: 18,6
MD [dB]: 7,4
sLV [dB]: 7,1

Kommentar:

Linkes Auge (OS) / 12.09.2017 / 14:16:00
Graustufe (CO)



Programme: 32 Standard Weiss/Weiss / Dynamisch
Parameter: 31,4 / 4000 asb III 100 ms
Fangfragen: 0/8 (0%) +, 2/9 (22%) -
Refraktion S/Z/A:
Pupille [mm]: 6,68
NV: T12 V2.1

Stimuli/Wiederholungen: 167 / 0
Dauer: 06:21
RF:
VA:
IOP [mmHg]:

30°
MS [dB]: 11,1
MD [dB]: 14,7
sLV [dB]: 7,5

Kommentar:

OCTOPUS®

EyeSuite™ Statistische Perimetrie
OCTOPUS 900, SN 639, V 1.17 / 1.1.6

HAAG-STREIT
DIAGNOSTICS

OCTOPUS®

EyeSuite™ Statistische Perimetrie
OCTOPUS 900, SN 639, V 2.3.0 / 3.3.1

HAAG-STREIT
DIAGNOSTICS

Abbildung 3 – „Fortschreitende Gesichtsfeldausfälle (Skotome) des linken Auges in der OCTOPUS® Perimetrie im Zeitraum vom 02/2014 – 09/2017“ - Mit freundlicher Genehmigung Priv.-Doz. Dr. med. Robert Hörster.

Die multifaktorielle Genese des Glaukoms ist komplex und bis heute noch nicht vollständig geklärt. Das Glaukom ist außerdem definiert als eine fortschreitende Erkrankung der retinalen Ganglienzellen, die sich am besten durch eine Aushöhlung des Sehnervenkopfes (auch Papillenexkavation) und Ausdünnung der retinalen Nervenfaserschicht beschreiben lässt.^[12] Diese Papillenexkavation lässt sich anhand einer Ophthalmoskopie (Abbildung 2) durch eine Blässe des neuroretinalen Randsaums und manchmal durch eine ‚bajonettartiger‘ Tiefenabknickung der Gefäße erkennen.^[12] Im bildgebenden Verfahren der optischen Kohärenztomografie (OCT) ist ein Glaukom anhand der Rarefizierung von Nervenfasern sowie einer Abnahme der neuroretinalen Randsaumdicke gekennzeichnet.

Klinisch gehen diese Veränderungen mit allmählich zunehmenden Gesichtsfeldverlusten einher.^[12,26] Diese Gesichtsfeldverluste beginnen typischerweise in der Peripherie und wandern langsam in das Zentrum des Gesichtsfeldes. Ein solcher Fall lässt sich gut in Abbildung 3 beobachten. Aufgrund dieses Verlaufs und des langsamen, graduellen Fortschreitens der Gesichtsfeldverluste wird die Erkrankung von Patienten häufig erst sehr spät wahrgenommen.^[12]

2.2.2. Formen des Glaukoms

Das Glaukom wird anhand verschiedener Abflussstörungen des Kammerwassers in verschiedene Formen klassifiziert. Aufgrund anatomischer Kriterien des Kammerwinkels kann zwischen dem Offenwinkel- und Engwinkel-Glaukom unterschieden werden. Der Kammerwinkel (KW) (Angulus iridocornealis) bezieht sich dabei auf den bereits in Kapitel 2.1. beschriebenen Winkel zwischen der Hornhaut und der Iris. Sollte dieser Winkel verringert sein, führt dies meist zu einer mechanischen Abflussstörung in der weniger Kammerwasser das Trabekelmaschenwerk erreicht und darüber abfließt.^[12] Bei einem Offenwinkelglaukom ist der Kammerwinkel durchgängig. Diese Form des Glaukoms kann wiederum in das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) und das sekundäre Offenwinkelglaukom unterschieden werden. Das sekundäre Offenwinkelglaukom unterscheidet sich vom POWG durch eine erkennbare Ursache für die Abflussstörung wie beispielsweise eine Pseudoexfoliation, Pigmentdispersion oder eine Kortison-Therapie von über drei Wochen. Eine solche erkennbare Ursache gibt es für das POWG nicht.

Bei der Klassifizierung des Glaukoms kann außerdem zwischen einem Hochdruckglaukom und dem Normaldruckglaukom unterschieden werden.^[12] Während beim POWG die glaukomatöse Symptomatik mit einem pathologischen Augeninnendruck von über 21mmHg auftritt, kann beim Normaldruckglaukom bei einem Druck von unter 21mmHg, der für gewöhnlich im Auge ungefährlich ist, eine Exkavation und Erosion des neuroretinalen Randsaumgewebes auftreten.^[12] Obwohl beim Normaldruckglaukom keine pathologisch erhöhten Augeninnendruckwerte gemessen werden, besteht die wichtigste

Behandlungsmaßnahme, genau wie beim primären Offenwinkelglaukom, nach wie vor im Regulieren des Augeninnendrucks.^[12,27] Es wird davon ausgegangen, dass auch beim NTG ein erheblicher Faktor mit dem Augeninnendruck zusammenhängt.^[12]

Aufgrund des überwiegenden Anteils des POWG an der Population des Glaukoms sowie der bisher ungeklärten Pathophysiologie bezieht sich diese Arbeit hauptsächlich auf das primäre Offenwinkelglaukom (POWG).

2.2.3. Epidemiologie

Das Glaukom ist weltweit mit 8%^[28] eine der führenden^[29] und in Ländern mit modernem Gesundheitssystem die zweithäufigste Ursache für irreversible Erblindungen (kurz nach der diabetischen Retinopathie).^[30] Ungefähr 11,2 Millionen Menschen auf dem Planeten leiden an einer Blindheit aufgrund eines Glaukoms.^[2] In Europa hat das POWG eine Prävalenz von 2,5%.^[31] Diese Prävalenz folgt einem stark altersabhängigen Trend. Im Alter von 40 Jahren sind nur 0,4% der Bevölkerung von einem Glaukom betroffen. Mit 50 schon 0,7%, mit 60 Jahren 1,4%, mit 70 Jahren 2,7%, mit 80 Jahren 5,3% und im Alter von 90 Jahren liegt die Prävalenz bei circa 10%.^[32] Männer sind dabei circa 1,3 mal so häufig betroffen wie Frauen.^[32] Von allen europäischen Erblindungsfällen sind 13% auf ein Glaukom zurückzuführen.^[33] Ungefähr jeder hundertste Bundesbürger in Deutschland leidet unter einem vom Augenarzt diagnostizierbaren Glaukom, welches ohne eine zügige Behandlung mit höchster Wahrscheinlichkeit zu einer Erblindung führen würde.^[30] Das POWG macht, in unterschiedlichen Populationen, mit zwischen ungefähr 30% und 50% der Gesamtmenge der Glaukompatienten einen sehr großen Teil der Fälle aus.^[10,12,34–36] Die Inzidenz des POWG liegt bei 40 bis 80 Jährigen über einen 5 Jahres Zeitraum ungefähr zwischen 0,5 und 1,5%, für ältere Menschen liegen bislang noch keine verlässlichen Daten vor.^[32] Hochrechnungen gehen davon aus, dass es bis zum Jahr 2040 weltweit ca. 112 Millionen Glaukompatienten geben wird.^[37] Aufgrund der Bevölkerungsentwicklung wird voraussichtlich ein Großteil dieser Patienten auf den asiatischen und afrikanischen Teil der Welt fallen, die nach wie vor in der Entwicklung ihrer Gesundheitssysteme großen Aufholbedarf haben.^[12] Ein weniger entwickeltes Gesundheitssystem verschlechtert die Diagnose und Prognose dabei natürlich deutlich, da nicht immer alle Patienten die notwendigen Behandlungen erhalten können und häufig nicht die technologischen und personellen Ressourcen zur Diagnostik und Therapie der gesamten Bevölkerung zur Verfügung stehen. Selbst in besser entwickelten Gesundheitssystemen wie beispielsweise in den vereinigten Staaten, in Irland oder in Australien wissen heutzutage nur schätzungsweise 50% der an einem Glaukom leidenden Bevölkerung von ihrer Erkrankung^[38–40], während es in Indien und verschiedenen afrikanischen Ländern lediglich um die 10% der Betroffenen sind.^[41,42] Damit wissen in

diesen Ländern, mangels diagnostischer Möglichkeiten, circa 90% der Bevölkerung nichts von ihrer Erkrankung.

In Ländern mit modernem Gesundheitssystem wie Kanada wurde eine frühe Diagnose und Behandlung des Glaukoms mit einer jährlichen Kostenersparnis von 40 Millionen US Dollar in Verbindung gebracht.^[43] In Europa betragen die Behandlungskosten für ein Glaukom im Spätstadium zwischen 429€ und 523€, während sich die jährlichen Kosten pro Glaukompatient aufgrund von weiteren Kostenfaktoren wie Rehabilitation und weiteres auf bis zu zwischen 1.1758€ und 1.9111€ belaufen.^[33] All dies zeigt deutlich, dass sowohl die Diagnose als auch die Therapie des Glaukoms weltweit noch erheblichen Verbesserungsbedarf hat und eine weitere Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge eine hohe Relevanz hat.

2.2.4. Mechanismen des Glaukoms

Die Mechanismen, die zur Klinik eines Glaukoms führen, sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Die vielversprechendsten Hypothesen stützen sich jedoch auf Mechanismen, die auf dem intraokulären Druck basieren.^[12] Der wissenschaftliche Konsens ist dabei, dass eine glaukomatöse optische Neuropathie eine Reaktion auf verstärkte zelluläre Stressbedingungen ist.^[12] Diese Stressbedingungen können unterschiedliche Ursachen haben. Zunächst besteht die Hypothese, dass es durch den erhöhten Augeninnendruck zu einer beeinträchtigten lokalen Durchblutung der retinalen Ganglionzellen des Sehnervenkopfes kommt. Diese verminderte Durchblutung sorge für einen stetigen Sauerstoff- und Nährstoffmangel, der zunächst zu einer axonalen Schädigung und weiter zu einer Degeneration der retinalen Ganglionzellen führe.^[12] Diese Schädigung würde hervorragend zu den pathologischen Befunden (Ausdünnung der retinalen Nervenfaserschicht) und klinischen Symptomen (zunehmende Gesichtsfeldverluste) passen. Es konnte unter Laborbedingungen bereits festgestellt werden, dass die Werte des Perfusionsdrucks, die zu einer Hypoxie des Sehnervs führen, sehr stark denen ähneln, die bei menschlichen Patienten das Risiko einer glaukomatösen Sehnervenatrophie erhöhen.^[44] Ein erhöhter intraokulärer Druck konnte außerdem mit einer Störung des axonalen Transportes in den Fasern des Sehnervs in Verbindung gebracht werden.^[9] Nervenzellen benötigen für ihre Funktionsweise einen stetigen Transport von Nährstoffen und anderen Molekülen vom Soma über das Axon zur Synapsenregion. In den Sehnerven von post mortem Glaukompatienten konnten Anzeichen ähnlicher Störungen des axonalen Transportes gefunden werden.^[45] Das Untergehen der Sehnerven würde ebenfalls zu den typischen glaukomatösen Symptomen passen.

2.2.5. Ursachen und Risikofaktoren für das Glaukom

Die Ursachen für das Glaukom beziehungsweise der vollständige Pathomechanismus des Glaukoms ist nach heutigem Kenntnisstand, aufgrund seiner komplexen multifaktoriellen Natur, nicht abschließend geklärt.^[25] Einige Risikofaktoren sind jedoch bekannt und geben einen Einblick in die zugrunde liegenden Pathomechanismen.

2.2.5.1. Der Augeninnendruck

Obwohl die Mechanismen, die zur Klinik eines Glaukoms führen, bis heute nicht vollständig aufgeklärt sind, stützen sich die vielversprechendsten Hypothesen jedoch auf Mechanismen, die auf dem intraokulären Druck basieren.^[12] Auch wenn ein erhöhter Augeninnendruck nicht mehr ausschließlich definitionsrelevant ist, spielt er jedoch weiterhin eine überragende Rolle als der Hauptrisikofaktor, der sowohl die Entstehung der Erkrankung als auch das Fortschreiten der Symptome stark begünstigt.^[46–48] Dieser Zusammenhang lässt sich klar dadurch erkennen, dass Patienten mit asymmetrisch erhöhtem Augeninnendruck überwiegend deutlich stärkere Gesichtsfeldausfälle desjenigen Auges mit dem höheren Augeninnendruck aufweisen als in dem Auge mit dem niedrigeren Druck.^[12,49,50] Es wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass ein erhöhter Augeninnendruck die Durchblutung der retinalen Ganglionzellen am Sehnervenkopf einschränkt.^[12] Durch diese eingeschränkte Durchblutung entstehe - so die Hypothese - ein stetiger Sauerstoff- und Nährstoffmangel, der zunächst zu einer axonalen Schädigung und weiter zu einer Degeneration der retinalen Ganglionzellen führe.^[12] Solch eine Schädigung decke sich mit den pathologischen Veränderungen (beispielsweise der Ausdünnung der retinalen Nervenfaserschicht) und mit den klinischen Symptomen eines Glaukoms (zunehmende Gesichtsfeldverluste). Ein erhöhter Augeninnendruck konnte bereits unter Laborbedingungen mit einer hypoxischen Veränderung des Sehnerven in Verbindung gebracht werden.^[44] Außerdem konnte eine Korrelation von Störungen des axonalen Transportes in den Fasern des Sehnerven mit einem erhöhten intraokulären Druck gefunden werden, welche im Verdacht steht zu Schädigungen an den Sehnerven zu führen.^[9] Auch bei bereits verstorbenen Glaukompatienten konnten Störungen des axonalen Transportweges in den Sehnerven nachgewiesen werden.^[45] Eine solche Schädigung der Sehnerven wäre den typischen glaukomatösen Symptomen konsistent. Unter ähnlichen anatomischen und physiologischen Gegebenheiten hebt sich der Augeninnendruck somit klar als der Hauptrisikofaktor ab. Bei okulärer Hypertension liegt das 5 Jahres Risiko einer Glaukomerkrankung bei circa 9%.^[32] Der Augeninnendruck wird außerdem als Hauptrisikofaktor benannt, da die primäre Therapie zur Verlangsamung der Symptomatik eines Glaukoms eine Absenkung des Augeninnendrucks ist.^[12] In den meisten Fällen wird diese Einstellung medikamentös durchgeführt. Bei schwereren Fällen kann der Augeninnendruck aber auch durch

Lasertrabekuloplastik (LTP), eine Trabekulektomie oder eine andere operative Glaukom Behandlung, beziehungsweise eine Kombination dieser Behandlungsformen gesenkt werden.^[12] All diese Gründe zeigen auf, dass der Augeninnendruck den wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms darstellt, auch wenn das Glaukom nicht mehr ausschließlich durch einen erhöhten Augeninnendruck definiert ist.

2.2.5.2. Ethnizität

Verschiedene Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Ethnizität der Patienten und einem erhöhten Risiko an einem Glaukom zu erkranken feststellen. Menschen mit afrikanischer Abstammung in Baltimore zeigten eine fast vierfach erhöhte Prävalenz eines primären Offenwinkelglaukoms im Vergleich zu den, in denselben Vierteln lebenden Personen, europäischer Abstammung.^[38] Es konnte in einigen Studien außerdem ein erhöhtes Risiko für eine Glaukomerkrankung in hispanischen, chinesischen und indischen Populationen festgestellt werden.^[12,32,41,51,52]

2.2.5.3. Alter

Nach dem Augeninnendruck ist einer der größten Risikofaktoren, der die Entstehung eines Glaukoms begünstigt, das Lebensalter, insbesondere ein besonders hohes Alter.^[12] Die Prävalenz für ein Glaukom folgt dabei einem exponentiellen Trend, so dass sie populationsübergreifend bei einem Alter um die 40 Jahre bei circa einem Prozent liegt, mit 50 Jahren circa 1,25% beträgt, mit 60 Jahren schon circa 2,4% mit 70 Jahren ungefähr 3,75% und mit 80 Jahren schon bei über 7,5% liegt.^[12,37,38] So nimmt die Prävalenz vom fünfzigsten zum neunzigsten Lebensjahr ungefähr um das Zehnfache zu.^[12,37,38] Auch die Inzidenz nimmt mit höherem Alter zu und steigt mit jedem Jahr um ungefähr das um das 1,07-Fache.^[32,53] Die Ursachen für dieses erhöhte altersabhängige Risiko sind vielfältig. In Augen erhöhten Alters konnte eine verstärkte Ablagerung von extrazellulärem Material sowie eine verringerte Zellmenge im Trabekelmaschenwerk nachgewiesen werden.^[12,54–57] Diese Veränderungen wurden mit einem altersbedingtem vermindertem Abfluss des Kammerwassers in Verbindung gebracht.^[12,58,59] Im Vergleich zu jüngeren Augen wurde außerdem eine „Steifigkeit“, beziehungsweise verminderte Elastizität des Trabekelmaschenwerks beobachtet, welche ebenfalls einen Grund für den altersbedingten verminderten Abfluss des Kammerwassers darstellen könnte.^[12,60]

2.2.5.4. Familienanamnese

Ein Zusammenhang zwischen an Glaukom erkrankten Familienmitgliedern wurde in zwei Studien nachgewiesen. Eine im Jahr 1994 in Baltimore (USA) durchgeführte Studie konnte

ein zwei bis vierfaches Risiko an einem Glaukom zu erkranken, im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen, wenn ein Elternteil oder Geschwister bereits erkrankt waren.^[61] Eine spätere im Jahr 1998 in Holland durchgeführte Studie konnte sogar ein neunfach erhöhtes Risiko im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen, wenn mindestens ein Geschwisterteil an einem Glaukom erkrankt war.^[12,62] Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass Personen mit einem Verwandten ersten Grades, welcher an einem Glaukom leidet, mindestens ein doppelt so hohes Risiko haben ebenfalls im Laufe ihres Lebens zu erkranken.^[32]

2.2.5.5. Genetische Marker

Obwohl einige genetische Gemeinsamkeiten unter Glaukompatienten identifiziert werden konnten und ein familiärer Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, gibt es bisher weder ein genaues Vererbungsmuster, noch einen klaren Zusammenhang zwischen bestimmten Genen und der Entstehung des Glaukoms.^[12] Das Glaukom scheint durch eine multifaktorielle Vererbung weitergegeben zu werden und die bis jetzt identifizierten genetischen Gemeinsamkeiten treten in Untersuchungen lediglich in einer geringen Zahl von Glaukompatienten auf. Diese genetischen Mutationen wurden im Myocilin-Gen^[63], Optineurin-Gen^[64] und in den Genen WDR36, CYP1B1 und ASB10 gefunden.^[12,64,65] Unter diesen Genen liegt ein besonderer Augenmerk auf den Mutationen im Myocilin-Gen, welche, in einer im Jahr 2013 durchgeführten Studie in Australien und Neuseeland, deutlich mit Glaukompatienten in einem fortgeschrittenen Stadium in Verbindung gebracht werden konnten.^[12,66]

2.2.5.6. Diabetes

Die Ergebnisse zweier Metaanalysen legen nahe, dass bei einem vorbestehenden Diabetes mellitus neben dem Risiko für eine diabetische Retinopathie, auch das Risiko an einem Glaukom zu erkranken ansteigt.^[12,67,68] Das Risiko, mit Diabetes an einem Glaukom zu erkranken, nimmt ungefähr 5 Prozentpunkte jedes Jahr nach der Diagnose zu.^[12,68] Die Höhe des Nüchternblutzuckerwertes wurde ebenfalls mit einem erhöhten Risiko einer glaukomatösen Erkrankung korreliert.^[68] Ein genauer Pathomechanismus, wie der Diabetes mit dem Glaukom zusammenhängt, konnte nicht abschließend geklärt werden.^[68]

2.2.5.7. Kurzsichtigkeit

Es konnte ein Zusammenhang zwischen einer hohen Myopie (starke Kurzsichtigkeit) und dem Risiko für das Entstehen eines Glaukoms hergestellt werden.^[32] Eine starke Kurzsichtigkeit wurde als mindestens -4 Dioptrien definiert und erhöhte das Glaukom Risiko

um das 2- bis 3-fache.^[32,69] Bei einer schwachen Kurzsichtigkeit konnte bislang kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden.

2.2.5.8. Papillenmorphologie

Es wurde eine Korrelation zwischen pathologisch erhöhten Werten beim Verhältnis von Papillenexkavationsgröße zur Papillengröße, dem so genannten vertikalen Cup-Disk-Ratio (CDR) und dem Glaukom gefunden.^[32]

Eine CDR von 0,6 und mehr wurde mit einem etwa 7-mal so hohen Risiko für das Auftreten eines Offenwinkelglaukoms in Verbindung gebracht. Eine CDR von 0,7 und mehr konnte sogar mit einem 14-fach erhöhten Risiko in Verbindung gebracht werden.^[32,70] Auch eine Papillenrandblutung erhöht das Risiko eines Glaukoms um etwa das 7,5-fache.^[32]

2.2.5.9. Transforming Growth Factor beta (TGF-β)

Der Transforming Growth Factor beta (TGF-β) ist eine Familie von Proteinen, welche in der Lage sind das Immunsystem zu regulieren.^[71] Bei einer ganzen Reihe von Erkrankungen konnte der TGF-β Signalweg mit einer Fibrose und insbesondere einer pathologisch verstärkten Ablagerung von extrazellulärer Matrix in Verbindung gebracht werden. So konnte dies beispielsweise in der Leber^[72], Pleura^[73] und Niere^[74] beobachtet werden.^[21] Mehrere unabhängige Studien konnten eine erhöhte Konzentration von TGF-β insbesondere der Unterform TGF-β₂ im Kammerwasser von Patienten mit primären Offenwinkelglaukom nachweisen.^[12,21,75,76] Erhöhte TGF-β Werte im Kammerwasser wurden mit einer verstärkten Ablagerung von extrazellulärem Material im Trabekelmaschenwerk sowie einer verminderten Wachstumsfähigkeit der Zellen des TM in Verbindung gebracht.^[12] Diese Ablagerung von extrazellulärem Material konnte außerdem in vitro an kultivierten Zellen des TM beobachtet werden.^[12,77,78] Unter Einfluss von TGF-β konnte außerdem eine verstärkte Vernetzung über kovalente Bindungen von Proteinen, die als extrazelluläres Material in das Trabekelmaschenwerk abgelegt wurden, mittels Transglutaminase und Lysyl-Oxidase nachgewiesen werden.^[12,78,79] In perfusionskultivierten Spenderaugen von Menschen sowie lebenden Mäuseaugen konnte eine Erhöhung des Augeninnendrucks bei Zunahme von TGF-β im Kammerwasser beobachtet werden.^[12,77,80,81] Obwohl der genaue Mechanismus nicht abschließend geklärt ist, besteht Grund zu der Annahme, dass ein erhöhter TGF-β Wert im Kammerwasser zu einer Versteifung sowie einer veränderten Kontraktilität des Gewebes des trabekulären Maschenwerkes und damit zu einem verstärkten Ausflusswiderstand führt.^[12,82] Der Transforming Growth Factor beta ist ebenfalls von Interesse, da er in einigen Studien bereits mit dem Zytokin Midkine in Verbindung gebracht werden konnte.^[83,84]

2.3. Das Zytokin Midkine

2.3.1. Allgemeine Beschreibung und Geschichte

Midkine (MK) (auch als neurite growth-promoting factor 2 bezeichnet) ist ein Zytokin und ein Wachstumsfaktor.^[85] Es gehört gemeinsam mit dem Zytokin Pleiotrophin (PTN), mit dem es in Säugetieren circa 50% Sequenzidentität besitzt, zu der Zweiergruppe der Heparin-bindenden Zytokine.^[85] Außer mit PTN besitzt MK keine Ähnlichkeit mit anderen Zytokinen oder Wachstumsfaktoren.^[86–88] Zytokine sind Proteine, die von verschiedenen Zellen zur Kommunikation mit anderen Zellen verwendet werden. Sie haben die Möglichkeit das Wachstum, die Differenzierung, die Proliferation und die Migration von Zielzellen einzuleiten, zu regulieren, sowie immunologische und entzündliche Reaktionen zu steuern. Auch MK hat eine deutlich größere Bandbreite von Funktionen als lediglich das Binden von Heparin. Über das Aktivieren von verschiedenen Zellrezeptoren ist es in der Lage eine Vielzahl von biologischen Funktionen verschiedener Zellen zu steuern.^[85,89,90] Diese Funktionen sind unter anderem die Migration, das Zellüberleben, die Reparatur und das Wachstum von Zellen, sowie die Genexpression und die Steuerung entzündlicher Vorgänge.^[85,89,90] Auf spezifische Vorgänge wird in den folgenden Absätzen genauer eingegangen.

MK wurde ursprünglich 1988 in einem Teratokarzinom-Maus-Tiermodell entdeckt. Durch Stimulation mit Retinolsäure produzierte das Gen Mdk auf dem Chromosom 2^[91] das 13 kDa schwere Protein Midkine.^[92] Retinolsäure (auch Vitamin-A-Säure, ein Stoffwechselprodukt von Vitamin A) wurde in diesem Versuch verwendet, da ein Ungleichgewicht von Retinolsäure in Geweben bereits länger dafür bekannt war, Teratome auszulösen. Teratome sind Keimzelltumoren, die verschiedenste Ausprägungen zeigen können, darunter unter anderem Haare, Zähne, Muskeln und Knochen. Wegen dieser Pluripotenz sind Teratome für die Krebsforschung von großem Interesse. Aufgrund der exakten zeitlichen und örtlichen Steuerung der Expression des MKs während der Embryogenese wurde es als wichtiges und vielversprechendes Forschungsziel deklariert und es wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.^[85] Der exakte physiologische Zeitpunkt der Expression während des mittleren Trimesters (engl. **Mid**gestation period) war für das **Mid**kine überdies namensgebend.

Die folgenden Untersuchungen zeigten zunächst, dass MK artenübergreifend vom Fisch bis zum Menschen in der Evolution größtenteils erhalten geblieben war^[89], was die Bedeutung und Notwendigkeit von MK im Organismus unterstreicht. Das Maus-MK hat dabei 87% Aminosäuresequenzidentität mit dem menschlichen MK.^[90] In Menschen wird MK vom MDK Gen gebildet, welches auf Chromosom 11 in p11.2 liegt.^[93] MDK hat vier Exonen^[94,95], die nach dem Spleißen übrig bleiben. Das fertig gebildete Molekül besteht aus zwei Domänen, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden welche für die spezifische dreidimensionale Struktur sorgen.^[89,96] Im Jahr 1990 konnten die vollständige Proteinsequenz des MKs sowie des PTNs entschlüsselt und veröffentlicht werden.^[86,87,92]

Physiologisch findet man MK hauptsächlich während des mittleren Trimesters. Während dieser Zeit ist es in besonders hohen Konzentrationen in Neural- und Epithelgewebe sowie Mesoderm enthalten.^[85,97,98] Dort ist es unter anderem für die Entwicklung der medialen Bodenplatte des Neuralrohrs verantwortlich und sorgt für ein Auswachsen von Neuriten und ein Überleben von embryonalen Neuronen.^[85,99,100]

Postembryonal ist MK physiologisch kaum im Körper nachweisbar. Lediglich in der Niere findet sich noch eine geringe Produktion.^[101] Das hängt damit zusammen, dass MK über Wirkung auf das Renin-Angiotensin-System (RAS), an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist. MK ist dabei in der Lage, zunächst das Enzym Protein-Kinase-C in Endothelzellen zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Dieses Enzym aktiviert daraufhin in der Signalkaskade das Angiotensin-Converting-Enzym, welches wiederum Angiotensin I zum potenten Vasopressor Angiotensin II umwandelt und damit den Blutdruck ansteigen lässt.^[89,102]

In weiteren Untersuchungen des MKs wurde festgestellt, dass es postembryonal und abgesehen von der Steuerung des Blutdrucks hauptsächlich in Verbindung zu verschiedenen pathologischen Vorgängen nachzuweisen war. Schnell zeigte sich, dass MK nicht nur in Teratomen, sondern auch in und im Zusammenhang mit einer Vielzahl von weiteren Tumoren nachgewiesen werden konnte. So wurde es beispielsweise in Leberzellkarzinomen^[103], Prostatakrebs^[104], Pankreaskopfkrebs^[105], Bauchspeicheldrüsenkrebs^[106], Astrozytomen^[107], Zervixkarzinomen^[108], Neuroblastomen^[109], Speiseröhrenkarzinomen^[110], Willm's Tumoren^[111], Magenkarzinomen^[112], Mundhöhlenkarzinomen, Kolorektalkarzinomen, Lungenkrebs, Hirntumoren und Neuroblastomen gefunden.^[89] Zusätzlich zu diesem Zusammenhang konnte außerdem ein Zusammenhang von erhöhten MK Konzentrationen mit einem ungünstigen Verlauf von verschiedenen Tumoren festgestellt werden, darunter: Blasenkrebs^[113], gastrointestinale Stroma-Tumoren^[114] und das humane Neuroblastom.^[89,115,116]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MK physiologisch postembryonal hauptsächlich das Überleben verschiedener Zellen unter widrigen Umständen sichert. Unter pathologischen Bedingungen führt dieses vermehrte Überleben zu der großen Anzahl von Tumoren, mit denen MK assoziiert werden konnte.

2.3.2. Midkine als Diagnostischer Marker

Midkine konnte in verschiedenen Studien mit dem Großteil aller Tumoren assoziiert werden und wird außerdem physiologisch lediglich im mittleren Trimester der Embryogenese in größeren Konzentrationen nachgewiesen. Aus diesem Grund liegt die Überlegung der Verwendung von MK als universal Tumormarker auf der Hand.

In Biopsien von Pankreastumoren konnte beispielsweise mithilfe einer real-time PCR eine erhöhte Konzentration von MK mRNA nachgewiesen werden.^[106] In kolorektalen Adenomen und Adenokarzinomen sind erhöhte MK Level in Biopsien sogar bereits in präkanzerösen Stadien nachweisbar.^[117] Die Verwendung von MK als Tumormarker beschränkt sich jedoch nicht nur auf Biopsien. So konnten bereits bei Neuroblastomen^[116] und gastrointestinalen Stromatumoren^[114] eine Korrelation mit erhöhten MK-Werten im Blutplasma gefunden werden. Dies ermöglicht eine deutlich weniger invasive Verwendung von MK als Tumormarker für gewisse Tumoren.

Es ist von großer Bedeutung, dass weitere Studien zur Spezifität und Sensitivität von MK für verschiedene Tumoren durchgeführt werden, um die Möglichkeit von MK als einen diagnostischen Marker abzuwägen. Mit Kosten von derzeit 4,41€ pro Test (423,41€ für 96 ELISA Tests)^[118] und den Risiken sowie potentiellen Komplikationen einer einfachen Blutentnahme beziehungsweise einer Biopsie stehen MK als Tumor-Screening Marker jedoch wenige Hürden im Weg.

2.3.3. Midkine Zusammenhang Entzündung

MK konnte mit mehreren Entzündungswegen in Verbindung gebracht werden. So konnte eine vermehrte Zellmigration von entzündlichen Leukozyten in Anwesenheit von MK in mehreren Versuchen und verschiedenen Geweben beobachtet werden.^[85,88,119,120] Die Migration der Leukozyten wurde dabei in verschiedenen Versuchen sowohl über den Mechanismus der Haptotaxis als auch über den der Chemotaxis beobachtet.^[119,120] In der Haptotaxis und der Chemotaxis wird die Zellmigration jeweils durch ein Gefälle des jeweiligen Botenstoffs gesteuert, welches sowohl positiv (zur höheren Konzentration hin) als auch negativ (von der hohen Konzentration weg) führen kann. Der Unterschied zwischen Chemo- und Haptotaxis liegt darin, dass in der Chemotaxis ein Konzentrationsgefälle eines in Flüssigkeit gelösten Stoffes für die Steuerung verantwortlich ist, während in der Haptotaxis ein Gefälle der Bindungsstärke eines strukturgebundenen Stoffes die Zellmigration steuert.^[121]

Neben den Leukozyten konnte MK außerdem mit einer Zellmigration von Makrophagen gebracht werden, welche ebenfalls eine Entzündungsreaktion begünstigen.^[120]

Eine weitere proinflammatorische Wirkung von MK wurde durch die Verstärkung der Synthese von Chemokinen beobachtet.^[88] Außerdem konnte MK mit einer lokalen Verringerung der Anzahl von regulatorischen T-Zellen in Verbindung gebracht werden, was einen Entzündungsprozess ebenfalls begünstigt.^[122]

2.3.4. Midkine im Zusammenhang mit Transforming Growth Factor beta (TGF- β) und der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT)

Das Zytokin Midkine konnte in verschiedenen Studien mit TGF- β assoziiert werden.^[83,84] Der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) ist eine Familie von Proteinen, welche in Verbindung mit einer Regulation des Immunsystems stehen.^[71] TGF- β ist außerdem gemeinsam mit weiteren Rezeptoren an einem Signalweg beteiligt, der zu einer Umwandlung von Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen führt.^[123] Der epithelial-mesenchymale Transitionsprozess (EMT) ist ein Vorgang, bei dem Epithelzellen ihre Zellpolarität verlieren und damit keinen definierbaren basalen oder apikalen Pol mehr aufweisen.^[123] Epithelzellen verlieren dabei außerdem ihre intrazellulären Kontakte und erlangen stammzellähnliche beziehungsweise mesenchymale Fähigkeiten wie Plastizität, Beweglichkeit und Invasionsfähigkeit, sowie eine Resistenz gegen Apoptose.^[123] Physiologisch findet sich dieser Vorgang vorwiegend in der Embryogenese und Wundheilung.^[123] Pathologisch ist er meist während der Metastasierung von Karzinomen zu beobachten.^[123] Es wird außerdem davon ausgegangen, dass der EMT ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Entzündungen und Fibrosen ist.^[124] Ein EMT-ähnlicher Prozess im Trabekelmaschenwerk gilt als starker Einflussfaktor für eine vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix und wird ebenfalls mit einem erhöhten Abflusswiderstand des Kammerwassers assoziiert, wodurch dieser zu einem Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms wird.^[124]

2.3.5. Midkine und Midkine-Inhibitoren als Behandlung

Aufgrund der zuvor erwähnten Verbindungen von MK mit verschiedenen pathologischen Vorgängen ist sowohl die Verwendung von Midkine selbst als auch von Substanzen, die Midkine inhibieren oder dessen Wirkung aufheben (im Folgenden als Midkine-Blocker bezeichnet) ein aussichtsreiches pharmakologisches Ziel, beziehungsweise eine potentielle Therapieoption. Inhibitoren des MKs konnten bereits vielversprechende Ergebnisse im Zusammenhang mit der Behandlung von Karzinomen^[125], von Rheumatoider Arthritis^[126], von Multipler Sklerose^[122], von Bluthochdruck^[127] und von Nierenkrankheiten^[88] erzielen.^[85]

Als möglicher Midkine-Blocker wurde bereits an einem Antisense-Oligodesoxyribonukleotid geforscht, welches die Produktion von dem Midkine-Protein mittels einer komplementären Basenpaarung an der Midkine-DNA bereits erfolgreich verhindern konnte.^[125,128]

Auch MK selbst konnte mit der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Darunter konnte eine mögliche Behandlung von ischämischen Hirnschädigungen^[129], von Netzhautdegeneration^[130] und von Herzinsuffizienz^[131] beobachtet werden.^[85] Die Behandlung des Glaukoms mittels der Blockierung von MK ist ein vielversprechendes Ziel für weitere Untersuchungen.

2.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der Erkrankung des Glaukoms und dem Zytokin Midkine. Es war aufgrund der vorbestehenden Literatur sehr wahrscheinlich, dass ein solcher Zusammenhang bestehen würde. Der Nachweis dafür war jedoch bisher noch nie experimentell durchgeführt worden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Studiendesign und Einschlusskriterien

Seit dem Juli 2017 wird die prospektive longitudinale klinische Beobachtungsstudie (*Erkelenz-Cologne Cataract Database*) des klinischen Verlaufs von Patienten mit Kataraktoperation, in einem überregionalen, operativen Augenzentrum (MVZ ADTC Mönchengladbach/Erkelenz) in Kooperation mit dem Zentrum für Augenheilkunde der Uniklinik in Köln durchgeführt. Alle beschriebenen Untersuchungen am Menschen wurden im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Vor der Durchführung der Studie wurde sowohl von der Ethikkommission der Uniklinik Köln, als auch der Ethikkommission der Ärztekammer Nordrhein eine Zustimmung eingeholt und am 02.01.2017 mit dem Zeichen 16-342 bestätigt. Nach vorheriger ärztlicher Aufklärung und Einverständnis wurden Patienten mit einer Indikation für eine Kataraktoperation, aufgrund von Trübung der kristallinen Augenlinse, in die Studie eingeschlossen. Ein Lebensalter unter 18 Jahren wurde als Ausschlusskriterium für den Einschluss in die Datenbank definiert. Um eine breite Analyse des klinischen Verlaufs nach Katarakt-Chirurgie zu gewähren, wurden keine weiteren Ausschlusskriterien festgelegt. Die persönlichen Daten der Patienten wurden durch Pseudoanonymisierung geschützt. Es steht den Patienten zu jeder Zeit frei, die Teilnahme an der Studie auf eigenen Wunsch ohne Angabe von Gründen zu beenden.

Sämtliche Patienten erhielten eine standardisierte Voruntersuchung bei der die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden: eine objektive und subjektive Refraktion, mit bestkorrigiertem Fernvisus in Snellen-Dezimal, eine applanatorische Druckmessung, eine Spaltlampen-Untersuchung von Vorderabschnitt und Fundusuntersuchung in Mydriasis, eine Laser-Gestützte Linsen Biometrie (*IOL Master 700, Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Deutschland*), eine Spektral-Domain Optische Kohärenztomographie (SD-OCT) (*Spectralis HRA+OCT; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland*, Scan-Areal 20° x 15° (5.9 x 4.4mm), 37 B-Scans, Distanz zwischen B-Scans 123mm) und eine Scheimpflug Topografie der Hornhaut (*Pentacam, OCULUS Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Deutschland*). Die Patienten erhielten am Tag 1, Tag 7 und Tag 21 eine postoperative Kontrolle, inklusive der folgenden Untersuchungen: Objektive und subjektive Refraktion, mit bestkorrigiertem Fernvisus (CDVA) in Snellen-Dezimal, applanatorische Druckmessung, sowie Spaltlampenuntersuchung von Vorderabschnitt und Fundusuntersuchung. Die SD-OCT-Untersuchung wurde ab Tag 7 in den Fällen wiederholt, in denen der BCVA 0,8 Snellen-Dezimal unterschritt. Sämtliche Vorerkrankungen, intra- und postoperative Konditionen und Komplikationen wurden dokumentiert und ausgewertet.

3.1.2. Probengewinnung

Während der Kataraktoperation, welche aufgrund einer Trübung der kristallinen Augenlinse durchgeführt wurde, wurden Proben entnommen. Diese Proben wurden intraoperativ durch die behandelnden Operateure über die bestehenden Operationszugänge (Parazentese) mittels einer 30G-Kanüle entnommen. Die hierbei gewonnene Vorderkammerflüssigkeit wurde, entgegen dem OP-Standard-Prozedere nicht verworfen, sondern in geeigneten Standard-Reaktionsgefäßen (100-200µl) aufgefangen und unmittelbar in einen dafür bereitstehenden Kühlschrank (-80°C) verbracht. Damit konnten sie für Folgeuntersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt verwendet werden.

3.1.3. Patientensubgruppen

Um die Midkine-Konzentrationen in verschiedenen okulären Erkrankungen zu bestimmen, wurden Vorderkammerproben von Patienten mit folgenden okulären Pathologien verwendet: primäres Offenwinkelglaukom, Pseudoexfoliationssyndrom, frühe und späte Makuladegeneration, sowie postoperatives Makulaödem. Darüber hinaus wurden Patienten, die den therapeutischen Alphablocker Tamsulosin einnehmen, untersucht.

3.1.4. Primäres Offenwinkelglaukom

POWG-Patienten wurden definiert als: Patienten mit einer auffälligen Papillenexkavation oder anderen charakteristischen morphologischen Veränderungen des Sehnervenkopfes oder der retinalen Nervenfaserschicht, bestimmt mittels Papillen-OCT-Untersuchung. Berücksichtigt wurden dabei Patienten mit und ohne typische Gesichtsfeldausfälle, sowie mit und ohne auffällig erhöhtem Augendruck beziehungsweise mit Hoch- und Niederdruckglaukom, vor Beginn einer Therapie.

3.1.5. Makulaödem

Ein postoperatives Makulaödem wurde definiert als eine Ansammlung von intraretinaler Flüssigkeit in der OCT-Untersuchung, die gleichzeitig zu einer Visusminderung auf 0,8 Snellen oder weniger führte. Diese musste per definitionem postoperativ auftreten und es wurde darauf geachtet, dass keine intraretinale Flüssigkeit bereits präoperativ in der OCT-Untersuchung vorhanden war.

3.1.6. Pseudoexfoliationssyndrom (PEX)

Als Pseudoexfoliation wird ein fibrillogranuläres Material bezeichnet, welches von der Iris abgeschieden wird und sich auf der Linse und im Kammerwinkel ablagert. Es stellt einen relevanten Risikofaktor für die Entwicklung von sekundärem Offenwinkelglaukom dar. Das Vorhandensein von PEX wurde dadurch definiert, dass die typischen Ablagerungen im vorderen Augenabschnitt auf der Linse und am Pupillarsaum gefunden werden konnten.

3.1.7. Frühe - altersbedingte Makuladegeneration (frühe AMD)

Eine frühe AMD wurde definiert, als das Vorliegen von Drusen in und unterhalb der Bruch'schen Membran und des retinalen Pigmentepithels, welche mittels OCT-Untersuchung nachgewiesen werden konnte. Insbesondere wurde das Vorliegen von atrophischen oder neovaskulären Bereichen ausgeschlossen, da diese Fälle als späte altersbedingte Makuladegeneration definiert wurden (siehe nächster Punkt).

3.1.8. Späte - altersbedingte Makuladegeneration (späte AMD)

Eine späte AMD wurde definiert, als das Vorliegen von neovaskulären Läsionen oder Atrophiearealen im Zusammenhang mit einer altersbedingten Makuladegeneration. Der Nachweis erfolgte ebenfalls mittels OCT-Untersuchung.

3.1.9. Tamsulosineinnahme

Tamsulosin ist ein Medikament aus der Gruppe der Alpha-Rezeptorenblocker und wird hauptsächlich für die symptomatische Behandlung von benigner Prostatahyperplasie eingenommen. Die antagonistische Blockade der $\alpha 1$ -Adrenozeptoren durch Tamsulosin führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur, insbesondere in der Harnröhre und der Prostata, wodurch der Harnabfluss erleichtert wird. Bei Kataraktoperationen kann unter Tamsulosin-Einnahme das so genannte „floppy-iris-syndrom“ auftreten, wobei eine inadäquate Erweiterung der Pupille die Operationsbedingungen erschwert.

3.2. Methoden

3.2.1. Statistische Analyse Verfahren

In dieser Untersuchung wurden einige statistische Verfahren verwendet um die vorliegenden

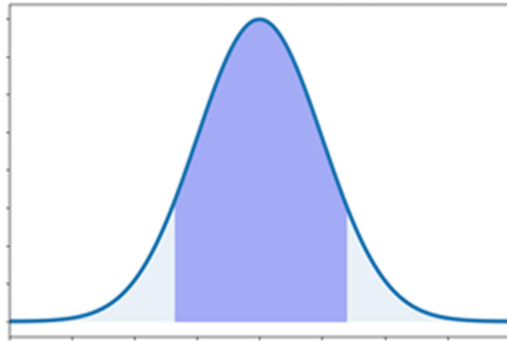


Abbildung 4 – Normalverteilung in einer gaußschen Glockenkurve. Eigenes Bild mit Python generiert.

Daten auszuwerten. Um den signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten des Zytokins Midkine in den untersuchten Patientengruppen mit den Messwerten der Kontrollgruppe nachzuweisen, wurden ein t-Test, eine ANOVA und ein Tukey's multiple comparisons Test verwendet. Da es für diese Verfahren relevant ist, ob die gemessenen Werte einer Normalverteilung folgen, wurden der Anderson-Darling Test, der Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test und der D'Agostino &

Pearson Test durchgeführt. Bei großen Stichproben greift der zentrale Grenzwertsatz, nach dem Stichprobenmittelwerte, näherungsweise normalverteilt sind. Bei eher kleinen Stichproben, wie in der vorliegenden Untersuchung, kann dies nicht gefahrlos angenommen werden. Aus diesem Grund werden die Daten vor der Durchführung eines t-Tests oder einer ANOVA, auf ihre Normalverteilung getestet. Sollte der Test statistisch signifikant sein, also eine zu große Abweichung von der Normalverteilung vorliegen, wird das nichtparametrische Gegenstück des jeweiligen Tests durchgeführt. Von einer Normalverteilung spricht man, wenn die Daten der Häufigkeitsverteilung einer gaußschen Glockenkurve folgen (siehe Abbildung 4). Da die Verteilung der Daten auf viele verschiedene Weisen von der Normalverteilung abweichen kann, werden im Folgenden stets alle drei genannten Tests auf Normalverteilung verwendet. Ein Ergebnis wird als „statistisch signifikant“ bezeichnet, wenn der p-Wert unter 0,05 liegt. Die testweise Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt dementsprechend 5%. Mit Ausnahme einer ANOVA, bei der mehrere Gruppen gleichzeitig verglichen werden, ist keine Korrektur für multiples Testen vorgesehen, da diese Arbeit keine konfirmatorischen Schlüsse zieht, sondern im statistischen Sinne explorativ ist.

Die Berechnungen in dieser Arbeit wurden fast ausschließlich mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism durchgeführt. Einige Berechnungen wurden mittels Python unter Zuhilfenahme der Statistik-Pakete pandas, numpy und matplotlib durchgeführt und einige Ergebnisse aus GraphPad Prism mittels Python gegengerechnet. Die hier verwendeten Grafiken zu den Daten wurden ebenfalls größtenteils mit GraphPad Prism und zu geringen Teilen mit Python generiert.

3.2.2. Glaukom Diagnostik

Die Diagnose des Glaukoms wurde anhand verschiedener diagnostischer Verfahren gestellt. Neben der klinischen Untersuchung der Patienten und einer Messung des Augeninnendrucks wurde insbesondere eine standardisierte Untersuchung der Gesichtsfeldausfälle mittels statischer Perimetrie erhoben und eine Untersuchung des Augenhintergrundes mittels Spaltlampen-Untersuchung in Mydriasis sowie eine Spektral-Domain Optische Kohärenztomographie (SD-OCT) durchgeführt.

3.2.3. Gesichtsfeld Perimetrie

Die Gesichtsfeldperimetrie beziehungsweise der Glaukom-Halbfeldtest erlaubt es, die Schäden der Glaukomerkrankung anhand der Gesichtsfeldverluste klinisch zu erheben.^[12,132] Der Patient wird dabei vor einen halbkugelförmigen Testschirm gesetzt, auf den Prüfmarken mit verschiedener Helligkeit an jedem Ort des Gesichtsfelds projiziert werden können.^[12,132] Während ein Auge des Patienten abgedeckt wird, fixiert der Patient das nicht abgedeckte Auge auf einen Punkt, der sich in der Mitte des Testschirms befindet und drückt eine Taste beim Erkennen einer der Punkte, welche anhand eines Algorithmus automatisch in verschiedenen Helligkeiten angezeigt werden.^[12,132] Ein Computerprogramm wertet diese Daten aus und gibt einen Schwellenwert für jeden der Punkte im Gesichtsfeld an, bei dem dieser für den Patienten sichtbar wird.^[132] Aus den so generierten Daten wird dann ein Bild errechnet (siehe Abbildung 3 im Kapitel 2.2.1.). Zeigen sich bei mindestens zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsterminen in zusammenhängenden Clustern von ≥ 3 nicht randständigen Punkten signifikante Abweichungen der Normalverteilung der nicht sichtbaren Punkte in einem glaukومتypischen Gesichtsfeldbereich, wird dies als glaukomatöser Schaden gewertet.^[132]

3.2.4. Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die Optische Kohärenztomographie (optical coherence tomography, „OCT“) ist ein nicht invasives bildgebendes Verfahren welches in der Lage ist, hochauflösende Schnittbilder der Mikrostruktur von biologischen Geweben, zu erzeugen.^[133,134] Diese Bilder können in durchsichtigen Geweben wie dem Auge oder Froschembryonen aus einer Tiefe von bis zu 2cm aufgenommen werden, stammen aber in der Praxis meist aus einer Tiefe von 1-2mm bei weniger durchsichtigen Geweben.^[133] Die OCT lässt sich als „Sonographie mit Licht anstatt von Schall“ beschreiben.^[133,135] Während ultraschallbasierte Verfahren deutlich tiefere Strukturen auflösen können, liegt der Vorteil bei der OCT in der sehr viel höheren Auflösung von $7.5\mu\text{m}$ in der lateralen Richtung und $5\mu\text{m}$ in der axialen Richtung im Vergleich zu minimal circa $100\mu\text{m}$ bei sonographischen Verfahren.^[135] Da in der Augenheilkunde

Infrarotlicht verwendet wird ist die OCT nicht invasiv und hat nahezu keine Kontraindikationen.^[135] Das kohärente Infrarotlicht wird mittels eines Niedrig-Energie-Diodenlasers an das Gewebe abgegeben und das zurückreflektierte Streulicht von einem Glasfaserinterferometer aufgenommen.^[135] Anhand der Zeitverzögerung und der Intensität des zurückgestreuten Lichts kann mit Hilfe der auftretenden Interferenzen im Glasfaserinterferometer ein zweidimensionales Bild generiert werden.^[135] Durch ein mehrfaches laterales Abtasten, beziehungsweise „Scannen“ des Lichtstrahles über das Gewebe können so auch dreidimensionale Bilder erzeugt werden.^[136] In der Augenheilkunde kann man auf diese Weise sehr unkompliziert einen mikroskopischen Einblick in die Histopathologie des Augenhintergrundes erlangen.^[135]

Für die Diagnose des Glaukoms wurde unter anderem ein OCT des Augenhintergrundes der Patienten herangezogen. Ausschlaggebend war dabei die Beurteilung der Nervenfaserdicke der Sehnerven an der Bruchmembran in der retinalen Nevenfaserschicht. Diese Werte wurden mit einer Normwertkurve der Gesamtbevölkerung verglichen und bei signifikanter Abweichung hiervon als pathologisch gewertet.

3.2.5. ELISA-Midkine-Analyse

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein etabliertes Nachweisverfahren zur Bestimmung von Proteinen und Proteinkonzentrationen in einer Vielzahl von Proben. Unter anderem lässt sich hiermit das Zytokin Midkine (welches ebenfalls ein Protein ist) bestimmen. Wie der Name Enzyme-linked Immunosorbent Assay bereits beschreibt, wird das jeweilige zu untersuchende Protein mittels spezifischen Antigens an eine Mikrotiterplatte gebunden. Daraufhin wird ein enzymatisch markierter Antikörper an das Zielmolekül (Sandwich-ELISA), oder an den primären Antikörper (indirekte ELISA) gebunden. Nach mehrmaligen Waschvorgängen zwischen den einzelnen Schritten wird nun ein, von dem Enzym umzusetzendes Substrat hinzugefügt. Die Umsetzung des Substrats mittels des Enzyms führt in den meisten Protokollen zu einem Farbumschlag, der proportional zur Menge des Zielmoleküls ist. Die präzise Menge des Substrats lässt sich somit mittels optischen Spektrometers bestimmen.

Im Fall dieser Arbeit wurde das „Human Midkine ELISA Development Kit“ der Firma PeproTech in Rocky Hill, USA verwendet. Dabei wurde das im Anhang beschriebene ELISA Protokoll fachgerecht durchgeführt (siehe „Human Midkine ELISA Development Kit 900-K190 Lot# 0206190“ im Anhang).

3.2.6. Immunhistochemische Färbung

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden Gewebeproben von Teilen des Trabekelmaschenwerks aus Augen mit sowie ohne Glaukom gewonnen. Diese Gewebeproben wurden mit einer immunhistochemischen Färbung behandelt und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Midkine untersucht.

Die Gewebeproben wurden hierfür zunächst für 30 Minuten in der Target Retrieval Solution (TRS) No.S1699 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) bei einem pH-Wert von 6,1 bei 95°C inkubiert. Als nächster Schritt wurde eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mittels einer Lösung aus phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) und einprozentigem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 10 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen Midkine, ab52637, rabbit, Clone EP1143Y (Abcam, Cambridge, UK) bei einer Verdünnung von 1:20 in einem Verdünnungsmedium (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten unter Raumtemperatur. Zur Signalverstärkung wurde daraufhin ein dreistufiges Detektionssystem eingesetzt, welches ebenfalls unter Raumtemperatur angewendet wurde. Zunächst wurde dafür ein sekundärer Antikörper mit Polylink (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten hinzugegeben. Danach erfolgte eine Markierung mit einem tertiären Antikörper inklusive Peroxidase-Markierung DetectionLine HRP, PD000RP (DCS Innovative Diagnostik Systeme, Hamburg, Deutschland) für weitere 20 Minuten.

Die Detektion erfolgte mittels 3-minütiger Inkubation mit dem AEC+ High Sensitivity Substrat-Chromogen K3461, ready-to-use (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Abschließend wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 30 Sekunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakteristika bei Baseline

In dieser Studie wurden 110 Patienten mit Indikation zur Kataraktoperation aus der Erkelenz Eye Database ausgewählt, davon 60 Männer und 50 Frauen. Von diesen 110 Patienten wiesen 10 ein Makulaödem, 10 ein Pseudoexfoliationssyndrom und 32 ein primäres Offenwinkelglaukom als Vorerkrankung auf. Zudem hatten 8 Patienten eine frühe und 11 Patienten eine späte altersbedingte Makuladegeneration. Weitere 8 der eingeschlossenen Patienten hatten den Alpha-Rezeptorblocker Tamsulosin in ihrer Medikamentenanamnese. Die restlichen 31 untersuchten Patienten stellten die Kontrollgruppe dar und zeichneten sich dadurch aus, dass sie, bis auf die operativ behandelte Katarakt, keine Vorerkrankungen hatten. Bei Baseline vor der Durchführung des Eingriffs betrug der Mittelwert $\pm$ der Standardabweichung und das minimale und maximale Alter der ausgewählten Patienten, an denen die Untersuchung durchgeführt wurde, $72 \pm 9,24$ (49-93) Jahre. Der mittlere gemessene Augeninnendruck der Patienten zu dieser Zeit lag bei $15 \pm 3,91$ (9-38) mmHg. Alle diese Patienten erhielten erfolgreich den indizierten Eingriff und es wurde eine Konzentrationsanalyse des Zytokins Midkine aus den entnommenen Kammerwasserproben durchgeführt. Im Studienverlauf mussten keine Patienten ausgeschlossen werden. Die Analyse und statistische Auswertung der Midkine-Konzentrationen im Kammerwasser erfolgte somit an allen 110 Patienten.

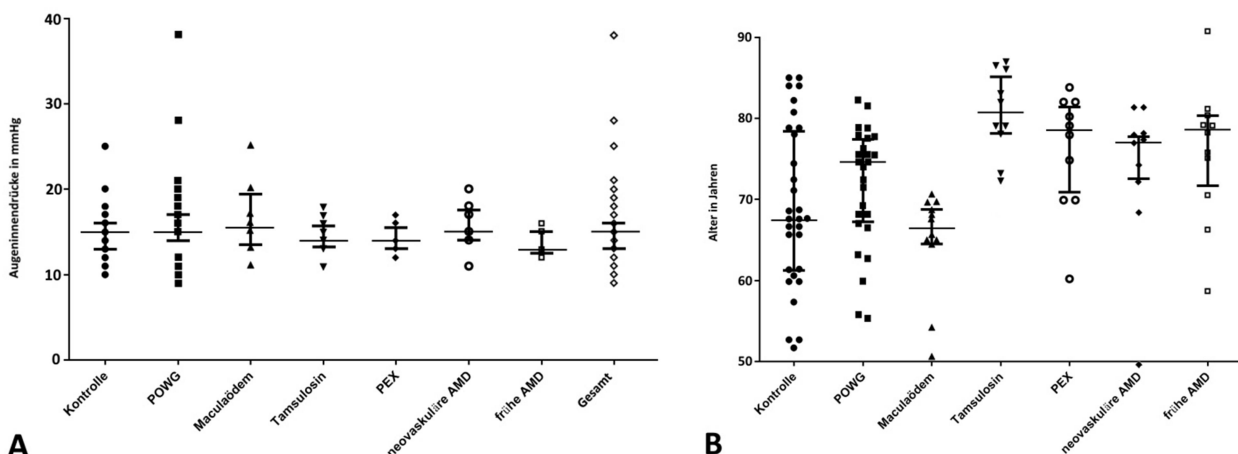


Abbildung 5 – Dotplot zweier Baseline-Kriterien; A: Niveau des intraokulären Drucks in mmHg bei verschiedenen Subgruppen unterschiedlicher Augenerkrankungen; B: Alter der verschiedenen Patienten unterschiedlicher Subgruppen in Jahren.

4.2. Midkine-Konzentrationen in Vorderkammerflüssigkeit

Um den Zusammenhang von Midkine und dem Glaukom nachzuweisen, wurden die Konzentrationen des Zytokins in den unterschiedlichen Proben des Kammerwassers mittels ELISA erhoben. Aus organisatorischen Gründen wurde die Untersuchung in zwei Chargen

zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Da die Midkine-Konzentrationen in den Kammerwasserproben keine absoluten Werte darstellen und nur in den jeweiligen Untersuchungen untereinander vergleichbar sind, wurden zwei isolierte statistische Auswertungen durchgeführt.

4.2.1. Midkine-Spiegel unterschiedlicher okulärer Erkrankungen verglichen mit Kontrollpatienten

Die Untersuchung der Midkine-Spiegel wurde zunächst an 12 Proben von Patienten mit Glaukom, 10 Patientenproben mit Makulaödem, 10 Patientenproben mit PEX, 11 Patientenproben mit neovaskulärer AMD und 8 Patientenproben mit früher AMD durchgeführt. Außerdem wurden Midkine-Spiegel von 8 Proben von Patienten mit Tamsulosin-Einnahme und 11 Kontrollproben von Patienten ohne eine Augenerkrankung erhoben. Diese Messwerte wurden zunächst sowohl graphisch als auch analytisch auf eine Normalverteilung untersucht. Dafür wurden sowohl ein Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test, so wie ein D'Agostino & Pearson Test durchgeführt um die Nullhypothese der normalverteilten Daten zu überprüfen.

Diese Untersuchungen geben einen Hinweis darauf, dass es bei den Daten, keine starke Abweichung von der Normalverteilung gibt.

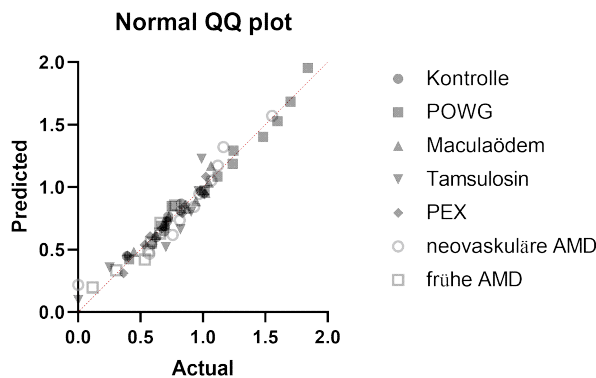


Abbildung 6 – QQ-Plot. Auftragung von erwarteten gegen tatsächliche Messwerte.

Da die von hier erhobenen Daten alleine wegen der Natur der durchgeführten Analyse (Proben aus Operationen) ein relativ kleines N an Stichprobenwerten aufweisen sollte zusätzlich eine graphische Analyse verwendet werden. Für die graphische Auswertung wurde dafür der Quantile-Quantile (QQ-Plot) verwendet (siehe Abbildung 6). Dabei ist zu erkennen, dass die Daten sich sehr nahe an der

Geraden der theoretischen Werte liegen. Auch diese Grafik liefert keine starken Hinweise darauf, dass keine Normalverteilung der Werte besteht. Bei einer Normalverteilung kann eine einfache Varianzanalyse ANOVA (ordinary one way ANOVA) durchgeführt werden. Die Varianzanalyse zeigt mit einem p-Wert von 0,001 einen hochsignifikanten Unterschied von POWG gegenüber der Kontrollgruppe.

Um für die mehrfache Testung von Datensätzen zu korrigieren wurde außerdem ein Tukey's multiple comparisons Test durchgeführt. Bei diesem konnte ein angepasster p-Wert von

0,0164 berechnet werden, was den Test weiterhin unter den Schwellenwert von 0,05 fallen lässt und damit als signifikant zu werten ist.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass POWG-Patienten im Vergleich mit Kontrollpatienten sowie den anderen untersuchten Erkrankungen signifikant höhere Midkine-Spiegel aufwiesen. Dieser Zusammenhang lässt sich ebenfalls gut in Abbildung 7 erkennen.

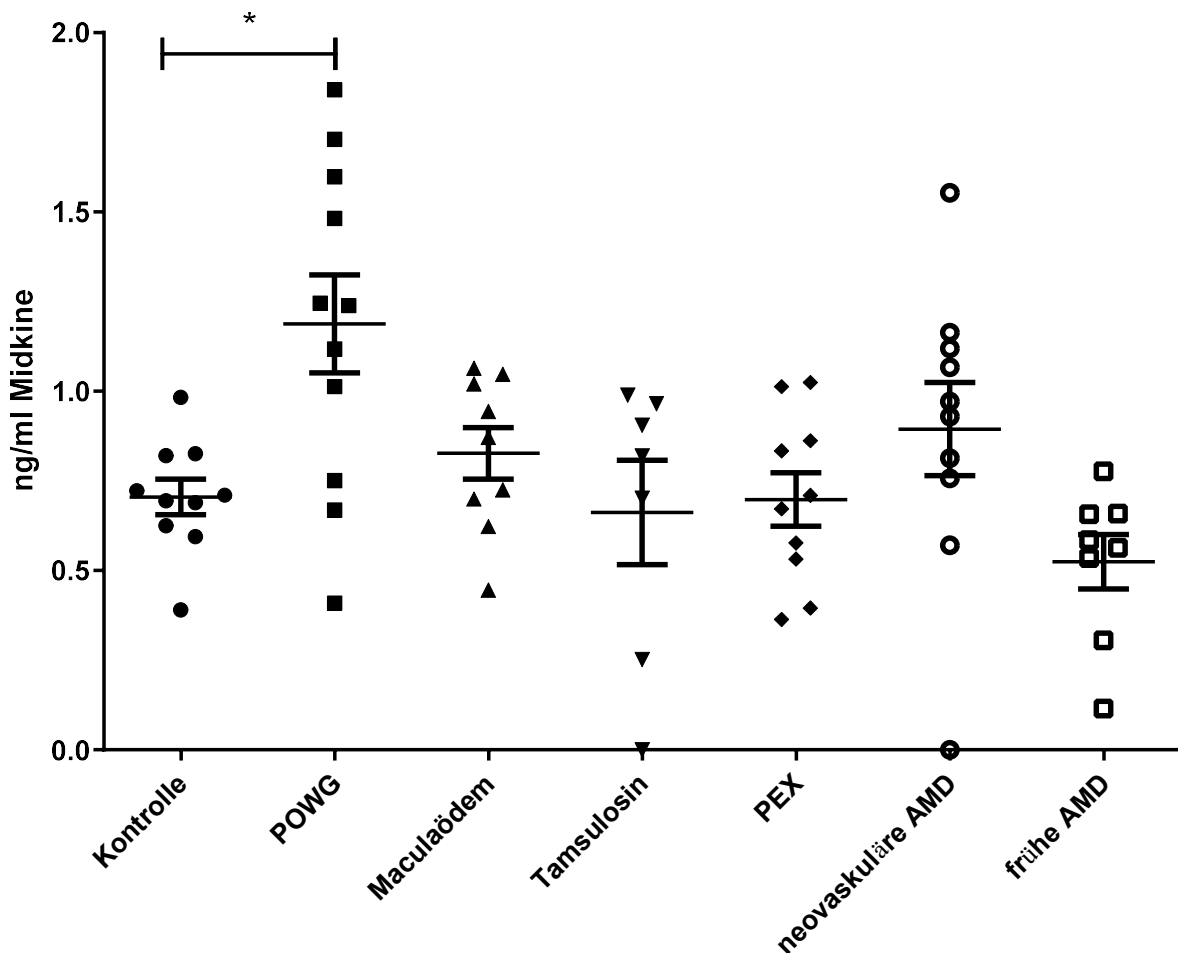


Abbildung 7 – Dotplot der Midkine-Konzentrationen in ng/ml von Proben unterschiedlicher Vorerkrankungen (Kontrollgruppe, primäres Offenwinkelglaukom, Makulaödem, Tamsulosineinnahme, Pseudoexfoliationssyndrom, neovaskuläre (späte) AMD, frühe AMD).

* Signifikante Erhöhung von Midkine-Spiegeln im Kammerwasser von Glaukompatienten, keine Erhöhung bei anderen Augenerkrankungen (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$).

4.2.2. Wiederholung der Analyse für Kontroll- und POWG- Patienten.

In einer zweiten Analyse wurden erneut Kammerwasserproben von 20 Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom und 20 Kontrollproben von Patienten ohne erfasste Vorerkrankungen, ausgenommen der Kataraktdiagnose, analysiert. Zunächst wurden auch diese Midkine-Konzentrationen sowohl graphisch als auch analytisch auf eine Normalverteilung mittels Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test und D'Agostino & Pearson Test untersucht. Außerdem wurde eine graphische Analyse mittels QQ-Plot durchgeführt.

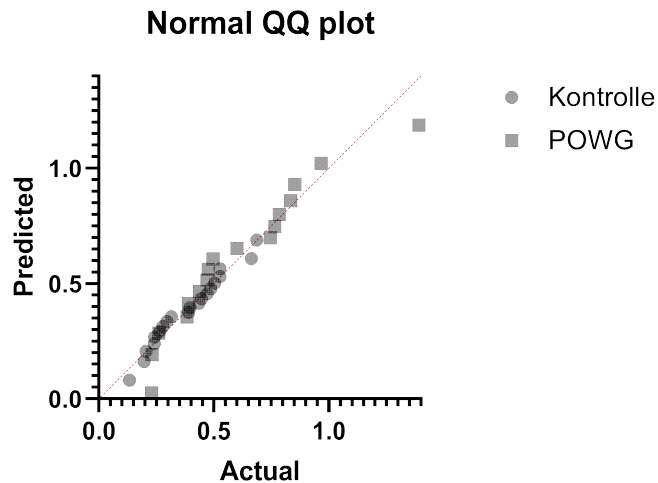


Abbildung 8 – QQ-Plot. Auftragung von erwarteten gegen tatsächliche Messwerte.

Durch die analytische Untersuchung konnte eine Normalverteilung der Erhobenen Daten angenommen werden. Wegen der möglichen Fehleranfälligkeit bei kleineren Datenmengen wurde auch hier eine Normalverteilung über einen Quantil-Quantil Plot durchgeführt (Abbildung 8). Die graphische Analyse dieses Plots lässt ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Normalverteilung schließen.

Bei der Annahme von einer Normalverteilung wurde ein ungepaarter t-Test von POWG Proben gegen die Kontrollgruppe durchgeführt. Hierbei konnte die Nullhypothese einer zufälligen Abweichung mit einem p-Wert von 0,0076 hochsignifikant verworfen werden.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass auch bei Wiederholung der Analyse für Kontroll- und POWG- Patienten erneut ein signifikant erhöhter Midkine-Spiegel im POWG verglichen mit Kontroll-Patienten gemessen werden konnte.

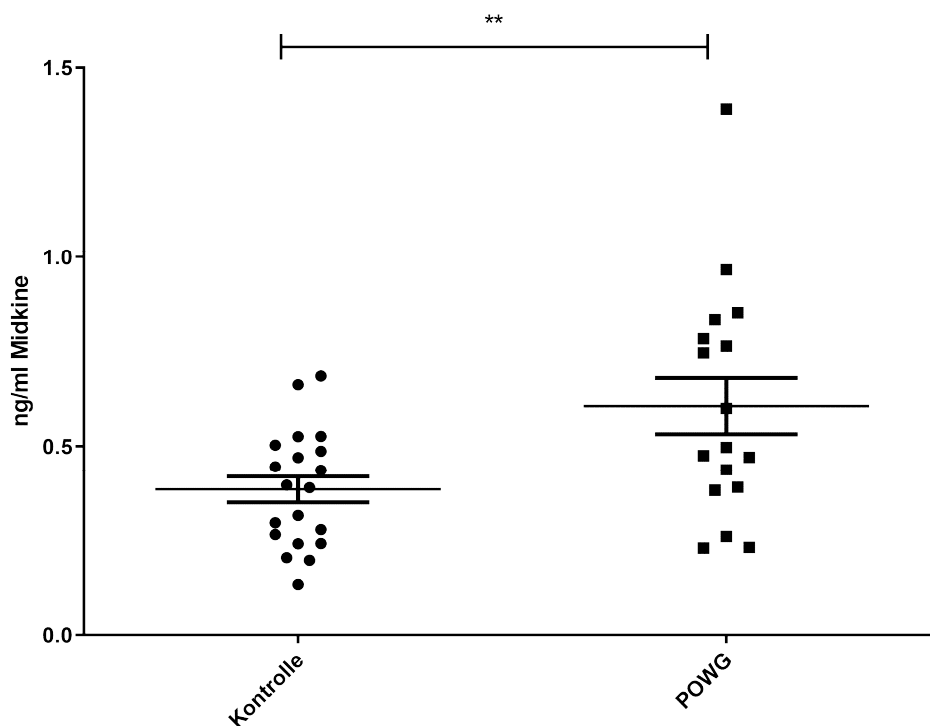


Abbildung 9 – Dotplot der Midkine Konzentrationen in ng/ml im Kammerwasser von Patienten mit POWG- und Kontrollpatienten. ** signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau $p \leq 0,01$).

4.3. Immunhistochemische Färbung und Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes

Bei einer Trabekulektomie wurden Gewebeproben des Trabekelmaschenwerkes als Restgewebe gewonnen. Eine Trabekulektomie stellt den Goldstandard zur operativen Augendrucksenkung bei Glaukom dar und wird beispielsweise durchgeführt, wenn eine medikamentöse Therapie nicht ausreichend ist. Im Rahmen dieser Operation wird ein 1x1mm großes Exzidat von Trabekelmaschenwerk und Sklera entfernt, um Kammerwasser unter die Bindehaut zu leiten und damit den Augeninnendruck zu senken. Dieses Exzidat wurde bei einer Routine-Operation entnommen und anstatt es, wie für gewöhnlich zu verwerfen, direkt in Formalin fixiert. Eine weitere Gewebeprobe konnte aus einem enukleierten Auge, eines Patienten ohne Glaukomerkrankung, gewonnen werden. Die fixierten Exzidate wurden daraufhin mittels des in Kapitel 3.2.6. beschriebenen Protokolls immunhistochemisch gefärbt. Diese immunhistochemisch gefärbten Gewebe wurden anschließend mikroskopisch untersucht und Fotografien dieser mikroskopischen Bilder angefertigt.

In den vorliegenden Abbildungen lässt sich erkennen, dass Midkine als braune Färbung im Exzidat des Auges mit primärem Offenwinkelglaukom in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes nachzuweisen ist. Im Auge ohne Glaukom ließ sich Midkine jedoch nicht nachweisen.

Da die Exzidate bei der Trabekulektomie sehr klein und fragil sind, konnten zwar 6 Exzidate gewonnen und immunhistochemisch angefärbt werden, jedoch auf Grund der Fragmentierung der übrigen Exzidate nur eines ausgewertet werden.

Abbildung 10 zeigt die Färbung des Exzidats aus der Trabekulektomie, Abbildung 11 zeigt die Kontrolle eines Bulbus ohne Glaukomerkrankung.

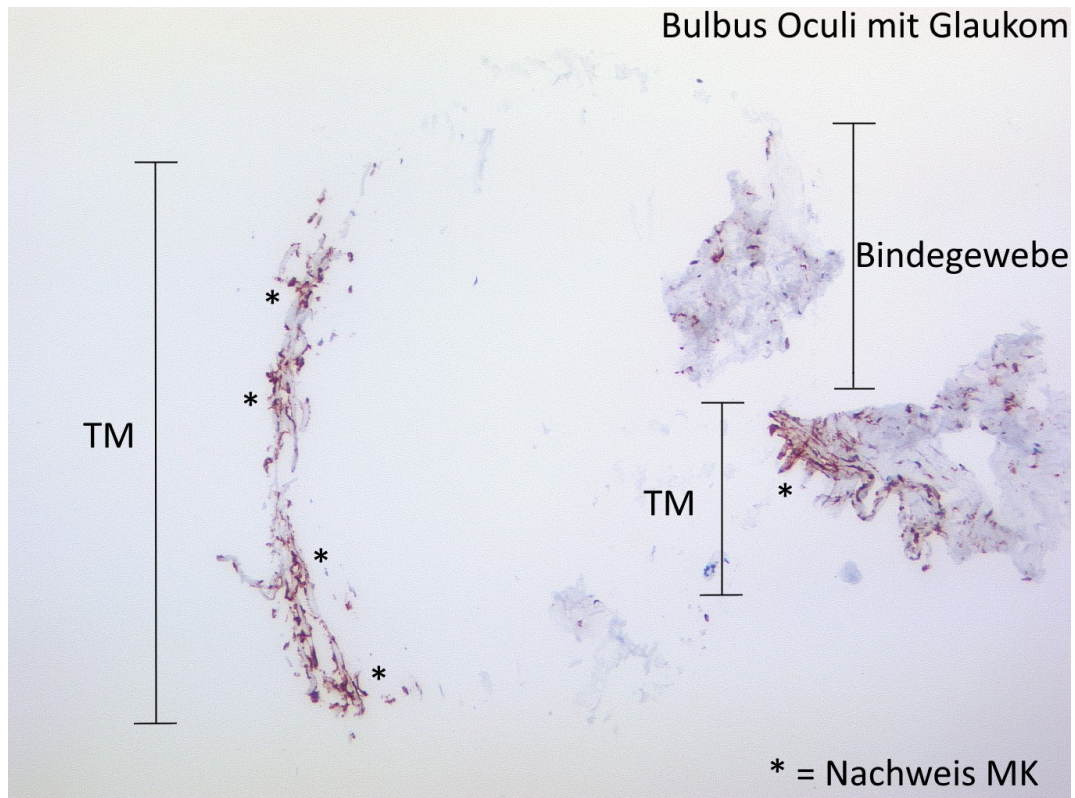


Abbildung 10 – Mikroskopische Abbildung (1:100) einer immunhistochemischen Färbung eines Bulbus oculi (Auge) eines Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom. Dargestellt sind Gewebestücke des Trabekelmaschenwerks (TM), welche auf Midkine (braun) angefärbt wurden (an den mit * markierten Stellen).

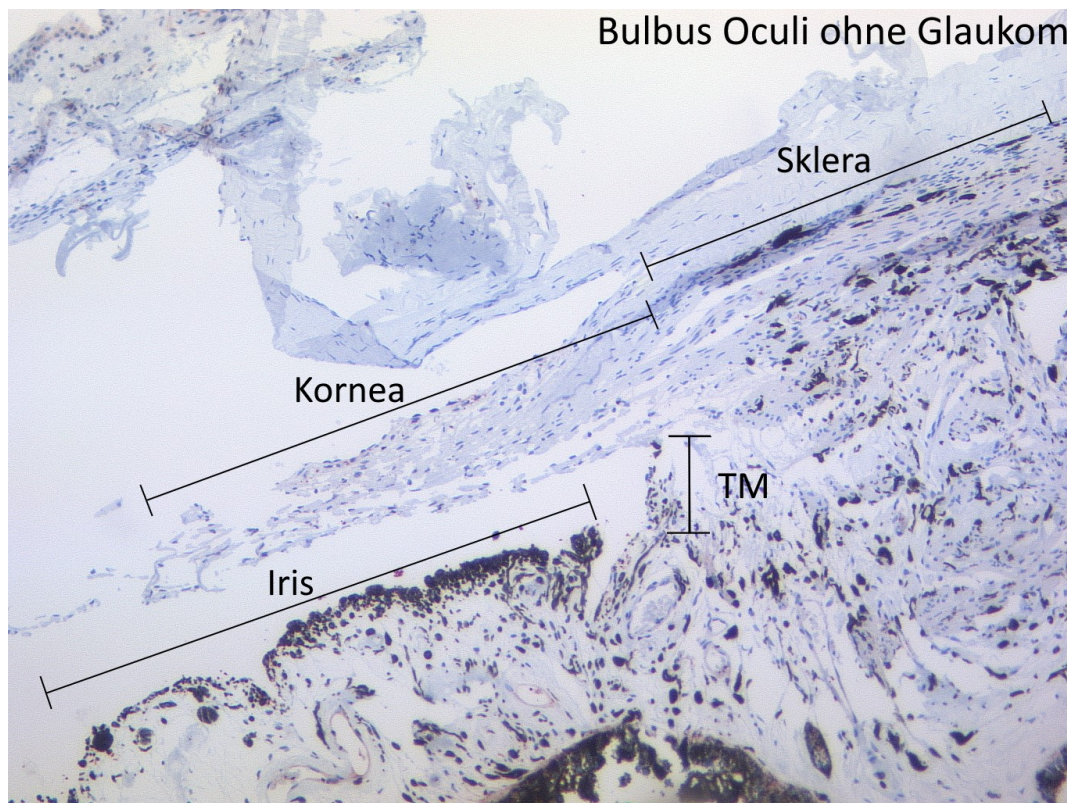


Abbildung 11 – Mikroskopische Abbildung einer immunhistochemischen Färbung des Kammerwinkels eines Bulbus oculi (Auge) ohne Glaukomerkrankung, welches durch Enukleation gewonnen wurde. Am Trabekelmaschenwerk (TM) lässt sich keine Midkine-Färbung nachweisen.

5. Diskussion

5.1. Allgemein

Das genaue Verständnis des Glaukoms ist von höchster Bedeutung, weil es sich um die Erkrankung handelt, welche derzeit weltweit die zweithäufigste Ursache für eine Erblindung darstellt. Trotz der stetigen Verbesserung von Therapie und Diagnostik aufgrund medizinischer Forschung ist die Pathophysiologie des primären Offenwinkelglaukoms bis heute nicht abschließend geklärt. Der stärkste Zusammenhang und bedeutendste Risikofaktor bleibt trotz dieser Unsicherheit jedoch weiterhin der Augeninnendruck.

In der vorliegenden Dissertation wurde eine Korrelation von erhöhten Werten des Zytokins Midkine und Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom hergestellt. In Anbetracht der hierzu bereits existierenden Literatur war ein solcher Zusammenhang nicht unwahrscheinlich. Es wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass erhöhte Werte des Zytokins TGF- β in Korrelation zu dem primären Offenwinkelglaukom stehen (siehe auch Kapitel 2.2.5.9.). Zudem konnte bei anderen Erkrankungen als dem Glaukom Midkine ebenfalls mit TGF- β korreliert werden. Die durch diese Untersuchung festgestellte Korrelation zwischen Midkine und dem POWG lässt verschiedene Interpretationsansätze zu. Der direkte Nachweis von MK an den Zellen des Trabekelmaschenwerkes lässt vermuten, dass MK genau an dieser Stelle die Entstehung eines Glaukoms begünstigt. Dies ist insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache anzunehmen, dass ein gestörter Abflussweg von Kammerwasser über das Trabekelmaschenwerk, mit einem daraus resultierenden erhöhten Augeninnendruck im Alter die wahrscheinlichste pathophysiologische Ursache für ein Glaukom ist.

5.2. Patientencharakteristika bei Baseline

Die in dieser Untersuchung erfassten Patienten zeigen bei Baseline eine relativ ausgeglichene Geschlechterverteilung mit 60 Männern (ca. 55%) und 50 Frauen (ca. 45%). Mit einer Alterspanne von 49 bis 93 Jahren und einem Mittelwert von 72 Jahren liegt in dieser Untersuchung eine ältere Patientenpopulation vor. Der Mittelwert von 72 Jahren mit einer Standardabweichung von ca. 9 Jahren (63 bis 81 Jahre) verdeutlicht zusätzlich das erhöhte Alter der Patientenpopulation. Dieser Umstand ist jedoch konsistent mit der vorliegenden Untersuchung. Zunächst ist festzustellen, dass ein erhöhtes Lebensalter in der Literatur als einer der stärksten Risikofaktoren für das Glaukom angesehen wird (siehe Kapitel 2.2.5.3.). Es ist somit folgerichtig, dass für die Untersuchung auch Patienten mit einem erhöhten Lebensalter ausgewählt wurden.

Weiterhin wurden in die Erkelenz-Cologne Cataract Database lediglich Patienten mit einem Lebensalter von mehr als 18 Jahren mit einer Indikation für eine Kataraktoperation

aufgenommen. Da die Katarakt-Erkrankung in einem erhöhten Lebensalter auftritt und die benötigte operative Therapie in der Regel in einem noch höheren Lebensalter durchgeführt wird, ist auch bei den untersuchten Patienten ein hohes Lebensalter zu erwarten. Das erhöhte Alter des Patientenkollektivs dürfte keinen maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung haben. Da das Glaukom zum überwiegenden Teil bei älteren Patienten auftritt, ist es schlüssig, die Untersuchung auch bei solchen Patienten durchzuführen.

Die Messung des Augeninnendrucks der Patientenpopulation bei Baseline lässt erkennen, dass nur wenige den für okuläre Hypertension definierten Messwert von 21mmHg überschreiten. Bei Patienten mit nAMD einer von 10 (10%), mit Makulaödem einer von 12 (8%), mit Glaukom 2 von 27 (7,4%), in der Kontrollgruppe einer von 31 (3%) und mit PEX, früher AMD und Tamsulosineinnahme kein einziger. Eine relativ ähnliche Verteilung der Augeninnendrucke lässt sich auch im Dotplot (Abbildung 5) erkennen. Das Bestehen einer glaukomatösen Erkrankung trotz physiologischer Augeninnendrucke ist auf eine antiglaukomatöse Therapie zurückzuführen, die zwar in dem Moment den Augeninnendruck absenkt, jedoch bereits entstandene Schäden nicht repariert. Obwohl sämtliche Glaukompatienten in dieser Studie eine solche medikamentöse Therapie zur Verringerung des Augeninnendrucks erhielten, kann dieser in Einzelfällen noch unzureichend eingestellt sein. Dies erklärt die Messergebnisse der Patienten, die formal einen zu hohen Augeninnendruck aufweisen. Bei einer relativ gleichmäßigen Verteilung der pathologischen Augeninnendrucke über die verschiedenen Subgruppen, ist eine Verzerrung der Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu erwarten.

5.3. Midkine-Konzentrationen in Vorderkammerflüssigkeit

5.3.1. Midkine-Spiegel unterschiedlicher okulärer Erkrankungen verglichen mit Kontrollpatienten

Zuerst erfolgte eine Untersuchung von MK in den Kammerwasserproben von Patienten mit Makulaödem, Pseudoexfoliationssyndrom, Glaukom, sowohl früher als auch später altersbedingter Makuladegeneration, der anamnestischen Einnahme von Tamsulosin sowie einer Kontrollgruppe. Die benannten Proben wurden dann untereinander sowie mit der Kontrollgruppe verglichen (siehe Kapitel 4.2.1.). Obwohl im Vorfeld die größte Wahrscheinlichkeit für einen erhöhten Wert von Midkine bei Patienten mit POWG angenommen wurde, bestand ebenfalls die Möglichkeit, dass eine der anderen untersuchten Gruppen einen erhöhten Midkine-Wert haben könnte. Um dies zu überprüfen, wurden die unterschiedlichen Patientengruppen in dieser ersten Analyse, ebenfalls untersucht.

Als Erstes wurden die Messwerte sowohl graphisch als auch analytisch auf eine Normalverteilung der MK-Konzentrationen geprüft. Die graphische Analyse auf eine Normalverteilung mittels QQ-Plot ist dabei die deutlich relevantere, da bei relativ kleinen Stichpunktswerten, die bei dieser Untersuchung vorliegen, eine analytische Untersuchung auf Normalverteilung eine höhere Fehleranfälligkeit aufweisen kann. In dieser Untersuchung zeigte sich sowohl in der analytischen als auch in der graphischen Analyse (siehe Abbildung 6) eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Normalverteilung. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte problemlos eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt werden, die eine Normalverteilung der Daten annimmt. In dieser zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der getesteten Patientengruppen. Um festzustellen, zwischen welcher der Gruppen genau der Unterschied besteht, wurde als post-hoc Test ein Tukey's multiple comparisons Test durchgeführt. Im Gegensatz zur ANOVA zeigt ein Tukey's multiple comparisons Test nicht nur an, dass es einen Unterschied zwischen verschiedenen untersuchten Daten-Gruppen gibt, sondern auch, wie groß dieser Unterschied ist und zwischen welchen Gruppen genau dieser Unterschied besteht. In dem hier durchgeführten Tukey's multiple comparisons Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den MK-Werten der Kontrollgruppe im Vergleich zu den MK-Werten der Gruppe der Glaukompatienten mit einem p-Wert von 0,0164. Es ergaben sich in diesem Test auch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen des Glaukoms und Tamsulosin, Glaukom und PEX, sowie Glaukom und früher AMD. Diese Ergebnisse zeugen von der signifikanten Erhöhung der MK-Werte von Glaukompatienten gegenüber der Kontrollgruppe sowie anderer Augenerkrankungen. Die Abweichung gegenüber anderer Augenerkrankungen ist jedoch für diese Untersuchung eher nebenbefundlich und hat nicht die gleiche Relevanz wie die signifikante Abweichung der MK-Werte der Gruppe der Glaukompatienten von der Kontrollgruppe.

5.3.2. Wiederholung der Analyse für Kontroll- und POWG- Patienten

Um eine größere Anzahl an Patienten in die Untersuchung einzuschließen wurde eine Wiederholung der Analyse von MK-Werten in der Vorderkammerflüssigkeit durchgeführt. Dieses Mal wurden ausschließlich 20 Patienten mit Glaukom gegen 20 Patienten einer Kontrollgruppe ohne ophthalmologisch relevante Erkrankungen durchgeführt. Dabei wurden ausschließlich Patienten aus der Erkelenz-Cologne Cataract Database ausgewählt, welche in der ersten Auswertung noch nicht analysiert worden waren. Da die absoluten MK-Werte von Essay zu Essay aufgrund der Tagesvariabilität unterschiedlich hoch ausfallen können und nur innerhalb eines Essays zweifelsfrei vergleichbar sind, wurden die statistischen Analysen zur Sicherheit strikt voneinander getrennt durchgeführt.

Die Messwerte der MK Konzentrationen in der Vorderkammerflüssigkeit wurden erneut analytisch sowie graphisch auf eine Normalverteilung untersucht. Auch bei dieser Analyse war, aufgrund der relativ geringen Anzahl der untersuchten Patienten, bei der analytischen Untersuchung mittels Anderson-Darling Test, Shapiro-Wilk Test, Kolmogorov-Smirnov Test und D'Agostino & Pearson Test, wie schon in der ersten Analyse, eine erhöhte Fehleranfälligkeit zu erwarten. Aus diesem Grund wurde der graphischen Analyse mittels QQ-Plot erneut eine deutlich größere Bedeutung beigemessen. Sowohl die analytische als auch die graphische Untersuchung (siehe Abbildung 8) ließen auf eine Normalverteilung schließen. Unter der Annahme einer Normalverteilung wurde nun ein ungepaarter t-Test durchgeführt, in dem die MK-Werte von Glaukompatienten mit denen der Kontrollgruppe verglichen wurden. Dabei konnte die Nullhypothese, welche auf eine zufällige Abweichung schließen ließ, mit einem p-Wert von 0,0076 hochsignifikant verworfen werden. Somit bestätigte sich erneut die zu Beginn aufgestellte Arbeitshypothese, dass das Glaukom hohe Korrelation mit dem Zytokin Midkine im Kammerwasser aufweist.

Diese Korrelation kann aufgrund der zwei durchgeführten Untersuchungen mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden. Obwohl die insgesamt niedrige Stichprobenanzahl selbstverständlich weiterhin beachtet werden sollte.

5.4. Immunhistochemische Färbung und Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Untersuchung der Midkine Konzentrationen im Kammerwasser zusätzlich mikroskopische Aufnahmen von immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben angefertigt. Diese Gewebeproben wurden zum einen als Restgewebe nach einer Trabekulektomie bei Glaukom und zum anderen aus einem enukleierten Bulbus eines nicht an Glaukom erkrankten Patienten als Kontrolle gewonnen. Bei einer Trabekulektomie, die zur operativen Augeninnendrucksenkung durchgeführt wird, fällt Gewebe des Trabekelmaschenwerkes regulär als Abfallprodukt an und konnte daher in diesem Fall für eine zusätzliche Untersuchung komplikationslos verwendet werden.

In den Färbungen dieser Gewebe konnte Midkine bei Glaukompatienten am Trabekelmaschenwerk (TM) detektiert werden, während bei der Kontrolle weder Midkine im TM noch im restlichen Auge nachgewiesen werden konnte.

Der direkte Nachweis von MK in den Zellen des Trabekelmaschenwerkes in Augen von Glaukompatienten gibt einen weiteren Hinweis auf den vermuteten pathophysiologischen Mechanismus zur Entstehung von Glaukom im Auge. Insbesondere die später in Kapitel 5.6.1 beschriebene „Autokrine-Midkine-Hypothese“ wird durch dieses Ergebnis deutlich wahrscheinlicher und die „Fremd-Midkine-Hypothese“ deutlich unwahrscheinlicher. Generell

deuten die immunhistochemischen Färbungen darauf hin, dass ein wesentlicher Effekt von Midkine in der Pathophysiologie des Glaukoms mit den Zellen und extrazellulären Strukturen des Trabekelmaschenwerkes zusammenhängt. Es gilt hierbei jedoch zu bedenken, dass die Menge der mikroskopischen Bilder sehr gering ist und nur lediglich in eine bestimmte Richtung weist. Die Daten dieser Dissertation weisen einen direkten pathophysiologischen Zusammenhang selbstverständlich nicht schlussendlich nach. Eine pathophysiologische Bedeutung des Proteins Midkine ist dabei jedoch denkbar und eine deutliche Vergesellschaftung von erhöhten Midkine-Werten und dem Glaukom konnte erkannt werden. Aufgrund der Fragilität der Exzidate, konnte lediglich eine immunhistochemische Färbung des Gewebes eines Glaukompatienten und nur eine immunhistochemische Färbung des Gewebes eines Patienten ohne Glaukom ausgewertet werden. Um allgemeinere und besser gesicherte Ergebnisse zu erhalten, wäre es essentiell, deutlich größere Patientengruppen in eine Untersuchung einzuschließen, in der eine weitere Analyse weiterer Exzidate durchgeführt werden kann. Diese Arbeit setzt für eine solche Untersuchung einen notwendigen Grundstein.

5.5. Midkine und TGF- β in der Pathophysiologie des Glaukoms

Obwohl die Pathophysiologie des Glaukoms nach wie vor nicht ausreichend erforscht ist, um eine abschließende Erklärung des Phänomens zu liefern, gilt in der Fachliteratur ein Zusammenhang der meisten POWG Fälle mit einem erhöhten Augeninnendruck als gesichert. Es wird außerdem davon ausgegangen, dass im Großteil der Fälle dieser erhöhte Augeninnendruck nicht durch eine Überproduktion des Kammerwassers oder durch dessen verminderten Abfluss über den uveoskleralen Weg, sondern durch einen gestörten Abflussweg des Trabekelmaschenwerkes ausgelöst wird (siehe Kapitel 2.1.) in dem die Produktion und verschiedenen Abflusswege des Kammerwassers beschrieben werden). Das Glaukom konnte außerdem in vorheriger Forschung bereits mit dem Zytokin TGF- β korreliert werden, welches in Verbindung mit einer pathologisch verstärkten Ablagerung von extrazellulärer Matrix in beispielsweise Leber, Pleura und Niere steht (siehe Kapitel 2.2.5.9.). Auch in Augen von Glaukompatienten konnten pathologisch erhöhte TGF- β Werte im Kammerwasser mit einer verstärkten Ablagerung von extrazellulärem Material im Trabekelmaschenwerk sowie einer verminderten Wachstumsfähigkeit der Zellen des TM in vorherigen Untersuchungen in Verbindung gebracht werden. In Fällen von Lungenfibrose und Multipler Sklerose konnten erhöhte TGF- β Werte außerdem bereits mit erhöhten Werten des Zytokins Midkine korreliert werden. Eine Beeinflussung von TGF- β durch MK ist auch im Auge durchaus denkbar. Es besteht Grund zu der Annahme, dass eine solche Ablagerung von extrazellulärem Material den Widerstand im Trabekelmaschenwerk erhöhen kann und zu einer Abflussstörung des Kammerwassers mit daraus resultierendem erhöhten

Augeninnendruck führen könnte. Ein weiterer Mechanismus, der im Verdacht steht, zu einer Abflussstörung mit daraus folgendem erhöhten Augeninnendruck zu führen, ist der epithelial-mesenchymale Transitionsprozess, kurz EMT (siehe Kapitel 2.3.4.). Dieser Prozess wird durch einen Signalweg ausgelöst, an dem unter anderem TGF- β beteiligt ist. Der EMT konnte dabei ebenfalls mit der Pathogenese von Entzündungen und Fibrosen in Verbindung gebracht werden und könnte ebenfalls zu einer Ablagerung von extrazellulärem Material im Trabekelmaschenwerk, sowie zu einem generell erhöhten Abflusswiderstand des Kammerwassers durch das TM führen. Einen Nachweis für diese Theorie gibt es nach derzeitigem Forschungsstand noch nicht. In weiteren Untersuchungen könnte dies näher beleuchtet werden.

5.6. Mögliche Interpretationen der Ergebnisse – Herkunft des Zytokins Midkine

In dieser Dissertation wurde eine Korrelation zwischen einem erhöhten Midkine-Level in der Vorderkammerflüssigkeit von Patienten mit Glaukom hergestellt. Diese Korrelation lässt jedoch nicht direkt auf eine bestimmte Kausalität schließen. Um eine Kausalität nachweisen zu können, sind weitere Untersuchungen und Experimente notwendig, um andere mögliche Ursachen auszuschließen und einen tatsächlichen kausalen Zusammenhang zu belegen. Da auch in diesem Fall nicht mit letzter Sicherheit festzustellen ist, welchen Ursprung das Midkine aus der, in dieser Dissertation nachgewiesenen Korrelation, von Glaukom und MK hat, lassen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse drei verschiedene Hypothesen zu. Diese Hypothesen werden in dieser Dissertation als „Autokrine-Midkine-Hypothese“, „Begleitphänomen-Midkine-Hypothese“ und „Fremd-Midkine-Hypothese“ bezeichnet.

Abseits dieser Hypothesen gilt es zudem, die „Henne-Ei-Problematik“ zu diskutieren, nämlich ob ein erhöhter MK-Wert aus einem erhöhten Augeninnendruck oder anderen glaukomatösen Veränderungen folgt, oder ob ein erhöhter MK-Wert zu glaukomatösen Veränderungen führt.

In dieser Untersuchung wurde außerdem mittels immunhistochemischer Färbung und mikroskopischer Untersuchung festgestellt, dass Midkine an Zellen des Trabekelmaschenwerkes im Auge eines Glaukompatienten vorhanden ist, während es im Auge eines Patienten ohne Glaukom nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse geben weitere Hinweise darauf, welche Ursache der Zusammenhang von MK und dem Glaukom haben könnte und welche Hypothese diesen Zusammenhang am besten erklären würde.

5.6.1. Autokrine-Midkine-Hypothese

Die „Autokrine-Midkine-Hypothese“ ist die wahrscheinlichste zur Erklärung der ausgewerteten Daten. Dieser Hypothese nach, ist die Erklärung für die Korrelation eines Glaukoms mit erhöhten Midkine-Konzentrationen in der Kammerflüssigkeit des Auges darin zu finden, dass Midkine von Zellen des Trabekelmaschenwerkes aufgrund von entzündlichen Prozessen, altersbedingter Überproduktion oder gegebenenfalls auch aus anderen Gründen, produziert und sezerniert wird. Dieses MK wirkt dann entweder autokrin an denselben Zellen, die es produziert haben, oder an benachbarten Zellen des Trabekelmaschenwerkes. Der Hypothese nach könnte die Wirkung von MK auf diese Zellen sowohl auf einen proinflammatorischen Prozess, eine verstärkte Proliferation von Zellen des Trabekelmaschenwerkes als auch auf eine, durch TGF- β moderierte Akkumulation von extrazellulärem Material zurückzuführen sein, sowie auf eine Kombination dieser Ursachen. Ein inflammatorischer Prozess könnte der Hypothese nach zu einem entzündungsbedingten Umbau der Zellen und damit zu einer partiellen Blockierung der Gewebiskanäle führen, wodurch der physiologische Abfluss durch das Trabekelmaschenwerk in den Kanal von Schlemm behindert werden könnte. Eine proinflammatorische Wirkung von MK könnte sich ebenfalls in einer direkten Schädigung oder sogar einem Untergang einiger Zellen des Trabekelmaschenwerkes äußern, wodurch ebenfalls der Abfluss von Kammerwasser durch das TM in den Kanal von Schlemm gestört werden könnte. Dies wäre in diesem Fall hypothetisch auf eine Störung der veränderten Physiologie der geschädigten/zerstörten Zellen oder auch durch eine Akkumulation von Abfallmaterial zurückzuführen. Auch eine tumorähnliche Wucherung oder Proliferation der Zellen des Trabekelmaschenwerkes mit einem daraus folgenden gestörten Abflussweg ist durchaus denkbar, obwohl eine solche Veränderung nicht in der mikroskopierten Gewebeprobe aus Kapitel 4.3. gesehen werden konnte. Weiterhin könnte ein durch MK moderierter proinflammatorischer Prozess über eine Chemotaxis zu einer Akkumulation und Infiltration von Entzündungszellen wie beispielsweise Neutrophilen und Makrophagen führen, die ihrerseits zu einer Schädigung und/oder Blockade des Trabekelmaschenwerkes führen könnten. Ein solcher proinflammatorischer Prozess mit Chemotaxis von Immunozyten konnte bereits in verschiedenen Geweben als Effekt von MK nachgewiesen werden.

Eine Ansammlung von überschüssigem extrazellulärem Material im Trabekelmaschenwerk wäre der Hypothese nach ebenfalls durchaus denkbar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- β in verschiedenen Geweben zu einer vermehrten Akkumulation von extrazellulärem Material führen kann. Ebenfalls konnte bereits in vorherigen Untersuchungen eine Verbindung von Midkine mit TGF- β festgestellt werden. Des Weiteren wurden in Kammerwasserproben von POWG-Augen bereits in vorherigen Untersuchungen, erhöhte TGF- β Konzentrationen nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.5.9.). Es ist gut denkbar, dass

durch TGF- β moderiertes, überschüssig produziertes Material im Trabekelmaschenwerk zu einem verminderten Abfluss des Kammerwassers in den Kanal von Schlemm führen kann. Bei einer physiologischen kontinuierlichen Produktion von Kammerwasser ist durch eine Störung des Abflusses ein Anstieg des Augeninnendrucks mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen. Ein erhöhter Augeninnendruck wiederum kann mit hoher Wahrscheinlichkeit als pathophysiologischer Mechanismus für ein Glaukom angenommen werden, da ein solcher, wie bereits beschrieben, den größten Risikofaktor für dieses darstellt.

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, die durchgeführt werden können um festzustellen, ob die Autokrine-Midkine-Hypothese oder eine der folgenden Hypothesen zutreffend ist. Zunächst besteht die theoretische Möglichkeit einer Blockierung von Midkine. Eine solche könnte hypothetisch auf unterschiedliche Weise erreicht werden, beispielsweise durch die Verwendung von Antikörpern gegen MK, die freies Midkine binden und inaktivieren. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Blockade oder Inaktivierung von Rezeptoren, an denen Midkine wirkt. Denkbar wäre ebenfalls eine Hemmung der Produktion von MK in den jeweiligen produzierenden Zellen im Auge. Eine solche wurde bereits in Experimenten eine Blockierung von Midkine mithilfe von Antisense-Oligodesoxyribonukleotid gegen MK erzielt (siehe Kapitel 2.3.5.). Ob eine gezielte Blockierung der Produktion von MK ausschließlich im Trabekelmaschenwerk oder auch nur im gesamten Auge zu erreichen ist, ist fraglich. Diese Ansätze sind jedoch noch sehr experimentell und kaum erforscht. Es bedarf daher noch weiterer Forschung um zu erkennen, ob eine solche Therapie machbar wäre, sollte die Autokrine-Midkine-Hypothese zutreffen. Es ist denkbar, solche Untersuchungen in Tierversuchsaugen oder in einer Organ-on-a-chip Situation durchzuführen. Weitere Untersuchungen könnten humane Spenderaugen einschließen, bei denen eine solche Blockierung erforscht wird. Sollte sich ein positiver Effekt bei geringen Nebenwirkungen zeigen, könnte auch eine Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt bei Versuchspatienten in vivo durchgeführt werden.

Zur weiteren Untersuchung wäre auch eine ähnliche Inaktivierung von TGF- β denkbar, wodurch der pathophysiologische Mechanismus eines Glaukoms weiter eruiert werden könnte. Außerdem könnte neben MK sowohl TGF- β , als auch speziell extrazelluläres Material immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch im Trabekelmaschenwerk von Spenderaugen von Glaukompatienten untersucht werden, um den Pathomechanismus des Glaukoms weiter aufzudecken.

Eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob die Autokrine-Midkine-Hypothese zutrifft, wäre ein gezieltes Einbringen von MK in Augen von Versuchstieren, in Zellkulturen oder in einem Organ-on-a-chip System und zu untersuchen, ob sich daraufhin glaukomatöse Veränderungen nachweisen lassen. Auch ein Einbringen von TGF- β in ein solches

Versuchsauge oder System mit Untersuchungen auf glaukomatöse Veränderungen wäre denkbar.

Insgesamt ist die Autokrine-Midkine-Hypothese als die wahrscheinlichste der vorliegenden Hypothesen anzusehen. Dennoch gibt es weitere mögliche Erklärungsansätze für die beobachteten Untersuchungsergebnisse. Diese Hypothesen und die Gründe für ihre geringere Wahrscheinlichkeit gegenüber der Autokrine-Midkine-Hypothese werden in den folgenden Absätzen erläutert.

5.6.2. Begleitphänomen-Hypothese

Eine weitere Hypothese, welche die erhöhten Werte von MK in der Vorderkammerflüssigkeit von Glaukompatienten erklären würde, ist die in dieser Dissertation als „Begleitphänomen-Hypothese“ benannte These. Diese postuliert, dass verschiedene Prozesse am Trabekelmaschenwerk zu einem Glaukom führen und dabei Midkine als Nebenprodukt auftritt. Das produzierte MK hat laut dieser Hypothese jedoch keinen Einfluss auf die Pathophysiologie des Glaukoms, sondern ist lediglich ein Marker, der diese glaukomatösen Prozesse anzeigt. Da es sich bei MK hauptsächlich um ein proinflammatorisches Zytokin handelt und es in deutlich erhöhten Konzentrationen in Augen von Glaukompatienten im Vergleich zu Patienten ohne relevante Augenerkrankungen vorkommt, ist auch unter dieser Hypothese sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den glaukomatösen Veränderungen im TM entweder um einen entzündlichen Prozess handelt, ein Zusammenspiel mit dem Zytokin TGF- β besteht oder eine Kombination aus diesen Zuständen besteht. So besteht unter dieser Hypothese auch die Möglichkeit, dass MK zwar hauptsächlich als Nebenprodukt auftritt, jedoch trotzdem eine geringe proinflammatorische Wirkung aufweist.

Sollte die Begleitphänomen-Hypothese zutreffen, würde dies für die Behandlung eines Glaukoms bedeuten, dass eine hypothetische pharmakologische Blockierung von MK an Zellen des Trabekelmaschenwerkes keinen oder kaum einen möglichen Therapieansatz darstellt. Eine hypothetische Blockierung von MK mit dem Ziel der Inhibition von TGF- β wäre unter der Annahme dieser Hypothese jedoch nach wie vor möglich. Weitere Untersuchungen, die zusätzliche Hinweise für die Richtigkeit beziehungsweise Unrichtigkeit dieser Hypothese liefern können, wären die folgenden: Zunächst wäre erneut eine Untersuchung an einer Zellkultur oder auch eine „Organ-on-a-Chip-Untersuchung“ denkbar, bei der MK auf ein (simuliertes) Trabekelmaschenwerk eingebracht wird und der erzielte Effekt beobachtet wird. Ebenfalls denkbar wäre eine Untersuchung im Tiermodell, bei der MK an das TM von Versuchsaugen gebracht wird. Bei der Begleitphänomen-Hypothese wäre jedoch zu erwarten, dass das Einbringen von MK keinen nennenswerten Effekt auf die Entstehung von glaukomatösen Bedingungen in dem Testauge verursacht. Auch ein Einbringen von TGF- β und eine Untersuchung, ob MK mit diesem in einem

Untersuchungsmodell auftaucht, sowie die Beobachtung von glaukomatösen Zusammenhängen in diesem Kontext wären vielversprechende Versuchsansätze.

Die Begleitphänomen-Hypothese ist aus den folgenden Gründen unwahrscheinlicher als die zuvor beschriebene Autokrine-Midkine-Hypothese. Es konnte bereits in vorherigen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen TGF- β und einem Glaukom hergestellt werden. Des Weiteren wurden in verschiedenen zuvor durchgeführten Untersuchungen ein Zusammenhang von MK mit TGF- β nachgewiesen, wodurch eine Wirkung von Midkine insgesamt wahrscheinlicher ist. Weiterhin ist die Wahrscheinlichkeit einer Wirkung von MK auf die Zellen des Trabekelmaschenwerks mit einer glaukomatösen Veränderung deutlich höher als keine Wirkung von MK, da eine solche Wirkung erklärbar und konsistent mit der Pathophysiologie eines Glaukoms ist. Andersherum folgt aus dem Nachweis einer Korrelation von MK und TGF- β sowie einer erklärbaren hypothetischen Pathophysiologie noch lange kein Beweis. Aus diesem Grund ist die Begleitphänomen-Hypothese zwar unwahrscheinlicher, jedoch eine Möglichkeit, die es zu diskutieren gilt.

5.6.3. Fremd-Midkine-Hypothese

Die in dieser Dissertation als „Fremd Midkine-Hypothese“ benannte Hypothese postuliert, dass das Zytokin Midkine aus anderen Gründen als dem Vorliegen eines Glaukoms von Zellen oder Strukturen im Auge erzeugt wird, welche sich nicht im Trabekelmaschenwerk befinden. Dies ist die unwahrscheinlichste hier aufgestellte Hypothese, die sich jedoch unter der gegenwärtigen Datenlage nicht abschließend ausschließen lässt. Es gibt weder Hinweise darauf, welche Zellen oder Strukturen im Auge eine solche Ausschüttung von Midkine verursachen könnten, noch darauf, dass eine solche Ausschüttung von MK stattfindet. Theoretisch sind aufgrund des erhöhten Alters des Patientenkollektivs jedoch einige Mechanismen denkbar, wie beispielsweise Zellentartungen, (chronisch) entzündliche Prozesse oder andere Alterungsprozesse. Das auf diesem Weg ausgeschüttete Midkine würde sich, der Hypothese nach, nun in der Kammerflüssigkeit anreichern und dann über den Kanal von Schlemm ausgeleitet. Die Hypothese postuliert weiter, dass das Midkine, welches auf diesem Weg zu den Zellen des Trabekelmaschenwerks gefunden hat, an diesen Zellen wirkt. Wie bereits zuvor beschrieben könnte diese Wirkung sowohl durch eine Ablagerung von vermehrtem extrazellulärem Material bedingt als auch entzündlicher Natur sein. Eine erhöhte Menge an extrazellulärem Material im Trabekelmaschenwerk würde der Hypothese nach zu Abflussstörungen von Kammerwasser und damit zu einem erhöhten Augeninnendruck führen. Dies würde wiederum das Risiko für die Entwicklung eines Glaukoms begünstigen. Entzündungsprozesse im Trabekelmaschenwerk könnten zu Schwellungen und Verengungen der Gewebekanäle führen, die für den Abfluss des Kammerwassers erforderlich sind. Darüber hinaus könnten die Entzündungsprozesse auch

zu direkten Schäden an den Zellen des Trabekelmaschenwerks führen, was ebenfalls zu einer Blockierung der Abflusswege führen könnte. Solche Prozesse könnten zu einer Erhöhung des Augeninnendruckes mit Erhöhung des Entstehungsrisikos eines Glaukoms führen. Diese Pathophysiologie ist ebenfalls mit der Autokrinen-Midkine-Hypothese konsistent.

Sollte die Fremd-Midkine-Hypothese zutreffen, wäre eine Therapie durch eine direkte Blockierung von Midkine an den Zellen des TM ebenfalls denkbar. Auf eine solche Blockade von Midkine wurde im Kapitel 5.6.1. bereits genauer eingegangen. In jedem Fall wäre beim Zutreffen der Fremd-Midkine-Hypothese das Zytokin Midkine als Marker zu gebrauchen, der in der Diagnostik des Glaukoms eine weitere Sicherheit darstellen kann.

Um zu untersuchen, ob die Fremd-Midkine-Hypothese korrekt ist oder ob die anderen Hypothesen wahrscheinlicher sind, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Der wirkliche Nachweis der Fremd-Midkine-Hypothese wäre jedoch lediglich dadurch erzielt, dass eine andere Quelle für das vorhandene Midkine gefunden wird, welches am Trabekelmaschenwerk akkumuliert. Die Fremd-Midkine-Hypothese könnte außerdem sicher widerlegt werden, indem mittels PCR-Analyse eine MK-Expression der Zellen des TM nachgewiesen würde. Für einen solchen Nachweis gab es in dieser Untersuchung jedoch nicht genug Material. Damit ist dieser Nachweis ein vielversprechendes Ziel für weitere Forschungsarbeiten.

Insgesamt ist die Fremd-Midkine-Hypothese aufgrund mehrerer Umstände als nicht sehr wahrscheinlich zu betrachten. Zunächst gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass Midkine von anderen Strukturen als dem Trabekelmaschenwerk in den Augen von Glaukompatienten produziert wird. Weiterhin ist es trotz des Ausfilterns von MK über das TM relativ unwahrscheinlich, dass Midkine dort auch akkumuliert. Schließlich ist es aufgrund der großen Menge von MK am TM deutlich wahrscheinlicher, dass MK auch von Zellen direkt am oder im TM produziert wird. Nichtsdestotrotz lässt sich diese Hypothese als Erklärung für die erhobenen Daten nach Stand der gegenwärtigen Untersuchung nicht vollständig ausschließen.

5.6.4. "Henne-Ei-Problematik"

Die sogenannte "Henne-Ei-Problematik", das heißt. die Frage, ob eine glaukomatöse Veränderung zu erhöhten MK-Werten führt oder – umgekehrt – erhöhte MK-Werte ein Glaukom begünstigen, besteht unabhängig von den zuvor behandelten Hypothesen. Hier gilt es zu diskutieren, ob die glaukomatöse Veränderung eines Auges eher zu erhöhten MK-Werten in der Vorderkammerflüssigkeit führt oder erhöhte MK-Konzentrationen in der Vorderkammerflüssigkeit zu glaukomatösen Veränderungen am TM führen. In gewisser Hinsicht wird diese Frage bereits in den vorherigen Absätzen behandelt. Dabei geht die

Begleitphänomen-Hypothese ausschließlich von einer „Glaukom-First-Situation“ aus, in der die erhöhten MK-Werte einer glaukomatösen Veränderung im Auge folgen. Die Fremd-Midkine-Hypothese geht demgegenüber von einer „MK-First-Situation“ aus, bei der die pathophysiologischen Veränderungen eine Reaktion auf MK sind. Die Autokrine-Midkine-Hypothese ist sowohl mit einer MK-First-Situation als auch einer Glaukom-First-Situation vereinbar. Allerdings ist eine Glaukom-First-Situation deutlich wahrscheinlicher und eine MK-First-Situation lediglich mit dieser Hypothese vereinbar, wenn als Reaktion auf MK pathophysiologische Prozesse ausgelöst werden, welche wiederum Zellen des TM dazu veranlassen, MK zu produzieren. Eine deutlich simplere und logischere Erklärung für das beobachtete Phänomen von erhöhten MK-Werten in der Vorderkammerflüssigkeit bei Augen mit Glaukomerkrankung ist ein autokriner Prozess, welcher nicht primär durch MK, sondern durch multifaktorielle Gründe ausgelöst wurde. Somit eine Glaukom-First-Situation. Diese Annahme ist insbesondere aufgrund des schleichenden Beginns einer Glaukomerkrankung und des erhöhten Altersgipfels der Patienten zu postulieren. Nichtsdestotrotz lassen sich die hier vorgestellten Hypothesen bei gegenwärtiger Datenlage weder abschließend beweisen noch ausschließen und es sind weitere Untersuchungen vonnöten um einen solchen Beweis, beziehungsweise einen solchen Ausschluss zu erhalten.

5.7. Midkine als Marker in der Diagnostik und zur Früherkennung des Glaukoms

Das Zytokin Midkine wird in der Tumorforschung bereits als vielversprechender Marker zur Erkennung von Tumoren und deren Schweregrad gehandelt (siehe Kapitel 2.3.2.). Es können pathologisch erhöhte MK-Konzentrationen in einer Vielzahl von Tumorbiopsien nachgewiesen werden. Bei Neuroblastomen und gastrointestinalen Stromatumoren können erhöhte MK-Werte sogar im Blut nachgewiesen werden. Das Glaukom ist nach wie vor eine Erkrankung, deren Diagnose nicht trivial ist. Verschiedene Fachärzte bewerten die Ophthalmoskopie derselben Patienten nicht immer gleich. Ein weiterer diagnostischer Marker könnte hier einen weiteren Anhaltspunkt geben und eventuell zu einer präziseren Diagnostik führen. Um eine solche zusätzliche Diagnostik zu ermöglichen, muss jedoch ein weniger invasiver Weg gefunden werden, Proben zu entnehmen und auf pathologisch erhöhte MK-Werte zu untersuchen als eine intraoperative Entnahme von Kammerwasser. Ob und wie aussagekräftig MK-Werte beispielsweise in Blutproben von Glaukompatienten nachgewiesen werden können, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Auch eine Untersuchung der Tränenflüssigkeit auf erhöhte MK-Werte ist trotz der sehr unterschiedlichen Produktionsorte aufgrund von Diffusion durch die Kornea zumindest denkbar, war jedoch nicht Teil der vorliegenden Untersuchung.

All diese theoretischen Diagnostikmethoden sind hochspekulativ. Nichtsdestotrotz stellt diese Dissertation einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in Richtung eines diagnostischen Markers für eine Glaukomerkrankung dar.

5.8. Midkine als Therapieziel in der Behandlung des Glaukoms

Aus der vorstehenden Untersuchung ergeben sich für das MK beziehungsweise die Verwendung von MK-Inhibitoren folgende Potentiale für die Glaukom-Therapie:

Sollte die Autokrine- oder die Fremd-MK Hypothese zutreffen und ein definitiver Zusammenhang von MK mit der Pathophysiologie des Glaukoms hergestellt werden können, wäre eine Therapie mit MK-blockierenden Substanzen denkbar. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es keine spezifischen Medikamente, die Midkine direkt inhibieren. Es werden jedoch bereits Ansätze erforscht, die Produktion und Aktivität von MK zu beeinflussen (siehe Kapitel 5.6.1. ff.). In Experimenten konnte bereits eine Blockierung von Midkine mithilfe von Antisense-Oligodesoxyribonukleotid gegen MK erzielt werden (siehe Kapitel 2.3.5.). Auch eine Verwendung von Antikörpern gegen das Zytokin MK selbst wäre denkbar, um eine Blockierung der Wirkung zu erzielen. Um über die Verwendung solcher Methoden diskutieren zu können sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Diese sind erforderlich, um den korrekten Pathomechanismus und die mögliche Wirksamkeit und Nebenwirkungen sowie Sicherheit solcher theoretischer Therapien bestimmen zu können.

5.9. Mögliche Schwächen und Limitationen der Dissertation

In jeder Forschungsarbeit gilt es, die eigene Untersuchung kritisch zu betrachten und mögliche Fehlerquellen und Schwachpunkte aufzuzeigen. Die häufigsten dieser Fehlerquellen, die die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigen können, lassen sich grob in Schwächen der internen und externen Validität einteilen.

Als Schwächen der internen Validität werden mögliche Fehlerquellen bezeichnet, die durch strukturelle Mängel im Studiendesign oder durch unkontrollierte Variablen entstehen und somit die Gültigkeit der kausalen Schlussfolgerungen beeinträchtigen. Probleme der externen Validität treten auf, wenn die Ergebnisse einer Studie nicht auf andere Populationen, Situationen oder Zeitpunkte verallgemeinert werden können, was die Übertragbarkeit der Befunde auf reale oder breitere Kontexte einschränken kann.

Zu Problemen der internen Validität zählen größtenteils: Selektionsbias mit konfundierenden Variablen, Messfehler, Dropout und die Stichprobengröße. Probleme der externen Validität äußern sich vor allem in Fehlern der Populationsvalidität, zeitlichen Validität und Situationsvalidität.

5.9.1. Selektionsbias

Ein Selektionsbias (auch Stichprobenverzerrung genannt) beschreibt eine nicht komplett zufällig gewählte Stichprobe. Dies führt dazu, dass die Verteilung der Merkmale von der Verteilung der Grundgesamtheit abweicht.

In einer Forschungsarbeit ist es nahezu unmöglich, einen Selektionsbias vollständig auszuschließen. Um valide Ergebnisse zu erhalten, ist es daher essentiell, einen solchen zu erkennen und möglichst zu kontrollieren. Häufig gibt es in Stichproben konfundierende Variablen. Konfundierende Variablen sind zusätzliche, unbeabsichtigte Faktoren, die mit den jeweiligen Variablen zusammenhängen können und unter Umständen zu einer Verzerrung der Ergebnisse führen können. Sie erschweren es, kausale Zusammenhänge herzustellen, da sich die beobachteten Ergebnisse nicht sicher auf die untersuchten unabhängigen Variablen zurückführen lassen.

Beispielsweise wäre es denkbar, dass Patienten mit POWG eher weniger „compliant“ sind und möglicherweise ihre Glaukommedikamente nicht regelmäßig einnehmen beziehungsweise applizieren. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass solche Patienten womöglich auch einen ungesunderen Lebensstil pflegen und sich eventuell auch weniger gesund als die Kontrollgruppe ohne weitere Augenerkrankungen ernähren. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass dies ebenfalls ein Faktor für erhöhte MK-Werte darstellt und damit möglicherweise die Ergebnisse dieser Untersuchung verzerrt sind. Um diesem Faktor entgegen zu wirken wurde mittels der wissenschaftlichen Suchfunktionen „<https://scholar.google.com/>“ und PubMed „<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/>“ eine umfangreiche Suche auf Deutsch und Englisch nach Studien zum Zusammenhang von Midkine mit Ernährung und Lebensstil durchgeführt. Diese Suche konnte keine Ergebnisse hervorbringen. Auch das Lesen der Vielzahl von Studien, die für diese Untersuchung durchgearbeitet worden waren, hat nie einen solchen Zusammenhang herstellen können.

Es wäre außerdem möglich, dass die Medikamente, welche gegen ein POWG eingesetzt werden, zu einer Steigerung der MK Konzentrationen im Kammerwasser führen. Die Patienten in dieser Studie, mit Indikation zur Absenkung des Augeninnendrucks, waren bereits alle mit einer antiglaukomatösen Therapie eingestellt. Dies liegt insbesondere an praktisch-ethischen Gründen im Studiendesign. Einem Patienten keine antiglaukomatöse Therapie zukommen zu lassen, während eine POWG Diagnose bestätigt ist, ist medizinisch nicht vertretbar. Die Wirkstoffe in Augentropfen, die in dieser Untersuchung verwendet wurden, um ein POWG zu therapieren waren: Acetazolamid, Betablocker, Alpha-Agonisten und Prostaglandin F_{2α} und Kombinationen dieser Medikamente. Acetazolamid ist ein Hemmstoff des Enzyms Carboanhydrase, wodurch die Bicarbonat-Konzentration im Kammerwasser abgesenkt wird. Alpha-Agonist Augentropfen wirken hauptsächlich über eine Bindung an den Alpha₂-Rezeptor, wodurch die Adenylatzyklase gehemmt wird, die

wiederum durch einen intrazellulären Abfall von cAMP zu einer verringerten Kammerwasserproduktion führt. Weiterhin steigt bei längerer Therapie zusätzlich der uveosklerale Abfluss, was zu einer weiteren Stabilisierung des Augeninnendrucks beiträgt. Betablocker wirken über eine Bindung an die β -adrenergen Rezeptoren. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht geklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass dies zu einer Reduktion der Kammerwassersekretion führt. Prostaglandin F₂ α als topische Applikation im Auge bindet sich selektiv an den Prostaglandin-F-Rezeptor und induziert eine Steigerung des Kammerwasserabflusses, wodurch eine Absenkung des Augeninnendrucks erreicht wird. Bei systemischer Anwendung wirkt Prostaglandin F₂ α insbesondere am Uterus. Bei der Menstruation löst Prostaglandin F₂ α eine Vasokonstriktion am Uterus mit Ischämie und nekrotischen Veränderungen des Endometriums aus. Außerdem werden durch eine Verstärkung der Wirkung von Oxytocin, Kontraktionen des Myometriums herbeigeführt. Alle diese Wirkstoffe haben eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit, die Konzentration von MK im Kammerwasser zu erhöhen. Bei der Betrachtung der pharmakologischen Wirkung der Therapien scheint eine Erhöhung von MK oder TGF- β nicht zu erwarten. Eine Verzerrung der Ergebnisse dieser Arbeit ist aufgrund der Medikamente daher nicht sehr wahrscheinlich. Eine Überprüfung dieses Umstandes bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Eine weitere Möglichkeit, wie die erhobenen Daten durch einen Selektionsbias verzerrt sein könnten, ist der Altersschwerpunkt der untersuchten Patientengruppen. Bei Betrachtung der Daten fällt auf, dass der Mittelwert des Alters der Patienten in der POWG-Gruppe mit 71,8 Jahren um 2,7 Jahre über dem der Kontrollgruppe liegt (69,1 Jahre). Dieser abweichende Altersschwerpunkt der POWG-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe war bereits während der Auswahl der Gruppen aufgefallen. In dem Patientenkollektiv von 1000 Kataraktpatienten war jedoch weder eine Auswahl der Kontrollgruppe möglich, die einen höheren Altersschwerpunkt aufwies, noch eine Auswahl der POWG-Gruppe, die einen niedrigeren Altersschwerpunkt aufwies. Dies lässt sich dadurch erklären, dass für die Kontrollgruppe Patienten mit einer Kataraktoperation ausgewählt wurden, die keine weiteren Augenerkrankungen wie Diabetes, Bluthochdruck, Glaukom, Makuladegeneration, Uveitis, Sicca, Makulaödem, Cornea guttata, Venenthrombose, Zentralarterienembolie, PEX, Tamsulosin-Einnahme, Netzhautdegeneration oder Gliose aufwiesen. Da mit einem höheren Alter auch mehr relevante Erkrankungen auftreten, konnte keine vorteilhaftere Auswahl getroffen werden. Ebenfalls war keine Auswahl eines niedrigeren mittleren Alters für die POWG-Gruppe möglich, da das primäre Offenwinkelglaukom erst in höherem Alter auftritt. Das Auftreten in früherem Alter war damit selten genug, dass kein jüngeres Patientenkollektiv aus den 1000 Patienten ausgewählt werden konnte. Bei weiterer Betrachtung ist zu erkennen, dass die getesteten Patientengruppen mit Tamsulosineinnahme, PEX, neovaskulärer AMD und früher AMD einen Altersschwerpunkt

noch über dem der POWG-Gruppe haben. Tamsulosin (80,8 Jahre), PEX (75,9 Jahre), neovaskuläre AMD (73,6 Jahre) und frühe AMD (72,6 Jahre). Da auch die Midkine-Werte dieser Gruppen statistisch signifikant niedriger sind als die der POWG-Gruppe, ist eine übermäßige Verzerrung der Ergebnisse in dieser Untersuchung unwahrscheinlich. Eine genauere Analyse bleibt weiteren Studien mit umfangreicheren Fallzahlen vorbehalten.

5.9.2. Messfehler

Ungenaue oder unzuverlässige Messmethoden für die Zytokinwerte könnten potentiell die Ergebnisse verfälschen. Es wurden für diese Arbeit die aktuellen Verfahren der Wissenschaft unter größter Sorgfalt verwendet. Eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund von Messfehlern ist sehr unwahrscheinlich.

5.9.3. Dropout

Ein Dropout bezeichnet das Verlassen von Patienten vor Abschluss der Studie. Dies kann beispielsweise aufgrund von Krankheit, Tod oder auf den Patientenwillen hin geschehen. Ein solcher Dropout hat die Möglichkeit die Studienergebnisse zu verzerren, trat jedoch in dieser Untersuchung nicht auf. Aus diesem Grund stellt ein Dropout keine mögliche Schwäche dieser Arbeit dar.

5.9.4. Die Stichprobengröße

In dieser Arbeit wurden Kammerwasserproben von insgesamt 110 Patienten hinsichtlich der bestehenden Midkine Konzentration untersucht. Bei 63 dieser Patientenproben wurde speziell auf einen Zusammenhang von Midkine mit der Erkrankung des Glaukoms eingegangen. Diese teilen sich auf zwei aufeinanderfolgende Untersuchungen mit unterschiedlich großen Stichprobengrößen auf. Zunächst wurden in einer breiteren Untersuchung unter anderem 12 Glaukompatienten mit 11 Kontrollpatienten verglichen und dabei eine signifikante Erhöhung der Midkine-Werte bei Glaukompatienten festgestellt. Um dieser Untersuchung mit einer größeren Stichprobe mehr Gewicht zu verleihen, wurde in einer zweiten Untersuchung die Kammerwasserkonzentration von 20 Glaukompatienten mit 20 Kontrollpatienten verglichen und erneut eine signifikant höhere Konzentration bei Glaukompatienten festgestellt. Dieser Untersuchungsteil verbessert die statistische Grundlage der Untersuchung deutlich. Obwohl sich durch diese zweite Untersuchung die Stichprobengröße von 23 auf 63 mehr als verdoppelt, ist trotzdem die gesamte Stichprobengröße nach wie vor relativ niedrig. Größere Stichprobengrößen ermöglichen generalisierbarere Aussagen zu den erhobenen Ergebnissen und verringern die Wahrscheinlichkeit zufällig statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, obwohl keine

bestehen (Fehler Typ 1). Zudem steigt durch die Vergrößerung der Stichprobe die Power des Tests, wodurch auch kleinere Effekte zuverlässiger detektiert werden können und nicht fälschlich als nicht bestehend analysiert werden (Fehler Typ 2).

Eine größere Stichprobengröße ließ sich in dieser explorativen Untersuchung aufgrund der begrenzten Ressourcen nicht realisieren. Zum einen wurden nur Patienten über 18 Jahren mit Indikation zu einer Kataraktoperation in die Datenbank eingeschlossen, aus der die Stichprobe für diese Untersuchung gewonnen wurde. Nur ein Bruchteil dieser Patienten hatte auch ein Glaukom als Vorerkrankung. Noch schwieriger gestaltete sich die Auswahl von Patienten ohne Vorerkrankungen, welche sich auf die Gesundheit der Augen auswirken und welche als Kontrollpatienten untersucht wurden.

Weiterhin war die Analyse der Kammerwasserproben auf Midkine aufgrund des hohen Standards besonders anspruchsvoll, da sie von angestellten labortechnischen Assistenten nach höchsten wissenschaftlichen Maßstäben durchgeführt wurde. Angesichts der zuvor beschriebenen Knappheit und des hohen Werts der Proben war eine möglichst professionelle und sorgfältige Untersuchung durch diese labortechnischen Assistenten essenziell. Zudem war der Einsatz dieser qualifizierten Fachkräfte mit hohen Kosten verbunden und aufgrund ihrer starken Auslastung nur begrenzt verfügbar.

Um die in dieser Arbeit demonstrierten Effekte und deren Interpretationen zu bestätigen, sowie die Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse auf größere Gruppen übertragen zu können, ist es essentiell weitere Forschungsarbeiten mit mehr Studienteilnehmern durchzuführen.

5.9.5. Populationsvalidität

Die Gesamtpopulation der 1000 Personen, die zum Zeitpunkt der Analyse in die Studie eingeschlossen waren und aus denen die Patienten für diese Analyse untersucht wurden, ist erwartungsgemäß keine einhundertprozentig repräsentative Menge der Normalbevölkerung. Aufgrund der Einschlusskriterien der Untersuchung (siehe Kapitel 3.1.1.) wurden ausschließlich Patienten über dem Alter von 18 Jahren, welche eine Kataraktoperation benötigten, in die Studie eingeschlossen. Die 110 ausgewählten Patienten für diese Untersuchung wiesen ein Alter von circa 49 bis 93 Jahren mit einem Mittelwert von circa 72 Jahren auf (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.1.). Das erhöhte Alter des Patientenkollektivs ist dem Studiendesign und dem Altersschwerpunkt des Glaukoms geschuldet. Das Studiendesign schloss lediglich Patienten mit einer Kataraktoperation in die Studie ein, da nur bei diesen Patienten die Kammerwasserproben entnommen werden konnten, ohne eine erhöhte Patientengefährdung in Kauf nehmen zu müssen. Da eine Katarakt erst in höherem Alter auftritt und die Notwendigkeit der Operation erst bei fortgeschrittener Pathologie indiziert ist, ist auch bei dem untersuchten Patientenkollektiv dieses höhere Alter zu erwarten. Der

Altersschwerpunkt des Glaukoms ist ebenfalls erhöht und das Alter eines Patienten mit einer operationswürdigen Katarakt überschneidet sich stark mit Patienten, welche ein Glaukom aufweisen. Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung eine sehr hohe Populationsvalidität mit einer Patientenpopulation mit indizierter Kataraktoperation und erhöhtem Alter haben. Eine Generalisierbarkeit auf ein Patientenkollektiv, bei dem eine Glaukomerkrankung denkbar wäre, ist definitiv anzunehmen. Die Verwendung der Ergebnisse zum generellen Verständnis pathophysiologischer Zusammenhänge ist, unter Berücksichtigung des erhöhten Alters, möglich. Die Populationsvalidität in dieser Untersuchung ist unter den gegebenen Umständen weitestgehend gegeben.

5.9.6. Zeitliche Validität

Die Untersuchung der zeitlichen Validität beinhaltet die Kontrolle der Genauigkeit der Ergebnisse über die Zeit hinweg. Die Proben für die vorliegende Untersuchung wurden in einem Zeitraum von circa 2 Jahren entnommen und durch Kälte konserviert. Bei der Analyse der Proben wurden die Midkine-Werte zum Zeitpunkt der Kataraktoperation erfasst. Es handelt sich somit um eine Querschnittsstudie (cross sectional study). Dabei werden zeitliche Veränderungen der MK-Werte nicht erfasst. Eine Fluktuation der MK-Werte, möglicherweise auch therapieabhängig, wurde hierdurch nicht erfasst. Eine solche Erfassung war studienbedingt jedoch nicht möglich. Der Grund, weshalb die MK-Werte überhaupt erfasst werden konnten, ist die risikolose Extraktion während der Kataraktoperation, bei der die Kammerwasserproben ohnehin anfallen. Eine Operation durchzuführen, nur um mehrere MK-Werte in einer longitudinalen Studie zu erhalten ist ethisch nicht vertretbar.

Für diese Untersuchung waren keine ausreichenden Daten zum Schweregrad der jeweiligen Glaukomerkrankungen erhoben worden. In einer folgenden Untersuchung wäre es interessant diese mit den unterschiedlich hohen MK-Werten zu vergleichen. Damit wäre es eventuell möglich, über ein größeres Patientenkollektiv eine longitudinale Studie annähernd zu simulieren.

5.9.7. Situationsvalidität

Die Situationsvalidität kontrolliert, inwiefern die Ergebnisse der Studie auf andere Kontexte, Rahmenbedingungen oder Voraussetzungen verallgemeinert werden können, die über die konkrete Situation, in der die Studie durchgeführt wurde, hinausgehen würden. Es gilt zu bewerten, ob die Ergebnisse auf unterschiedliche Bevölkerungsgruppen, oder an anderen Standorten oder in verschiedenen klinischen Umgebungen übertragen werden können und dort ebenfalls gültig sind.

Da ausschließlich Patienten, bei denen eine Kataraktoperation durchgeführt wurde, in die Studie eingeschlossen waren, könnten auch die Ergebnisse dahingehend verzerrt sein. Es besteht die Möglichkeit, dass die durchgeführte Operation die Entzündungswerte der jeweiligen Kammerwasserproben angehoben hat. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass eine operative Entzündung mit darauffolgendem hypothetischem MK-Wert Anstieg bei der sehr kurzen Kataraktoperation bis zum Entnahmezeitpunkt eine deutliche Erhöhung zu den Vorwerten zeigt. Somit sollte dieser Umstand keinen Einfluss auf die erhobenen Daten haben. Auch eine vorliegende Katarakt sollte keinen starken Einfluss auf sowohl MK-Werte als auch auf die Pathogenese des Glaukoms haben. Damit besteht ein geringes Risiko, dass die Ergebnisse dieser Studie sich nicht auf Patienten ohne eine Katarakt oder eine Kataraktoperation übertragen lassen.

Ein deutlich wahrscheinlicher Umstand, der die externe Validität der Ergebnisse beeinflussen könnte ist die Ethnizität der Studienteilnehmer. Da größtenteils Patienten und Patientinnen im Kreis Heinsberg und vorwiegend in der Stadt Erkelenz in die Studie einbezogen wurden, spiegelt sich die Bevölkerungsverteilung in diesem Gebiet im Patientenkollektiv wider. Wie im Kapitel 2.2.5.2. dargestellt, besteht bei der Erkrankung des POWG ein Zusammenhang mit der Ethnizität der Patienten. Die Ergebnisse dieser Studie sind demnach gegebenenfalls hauptsächlich auf Patienten europäischer Abstammung anzuwenden. Da es trotz unterschiedlicher Prävalenz des POWG in unterschiedlichen ethnischen Gruppen jedoch eher unwahrscheinlich ist, dass die Pathophysiologie und Biochemie in diesen Augen sehr stark voneinander abweichen, bleiben die Ergebnisse höchstwahrscheinlich auch bei nicht untersuchten ethnischen Gruppen größtenteils valide.

Gegebenenfalls könnten die Ergebnisse außerdem nicht für Patientenkollektive in anderen Gesundheitssystemen oder Ländern und mit anderen Umweltrichtlinien generalisierbar sein. Eine sehr starke Abweichung der Generalisierbarkeit der hier ermittelten Ergebnisse scheint jedoch auch in diesen Fällen nicht sehr wahrscheinlich. Es ist nicht davon auszugehen, dass sich die Pathophysiologie und Immunologie der Augen stark durch diese Umstände unterscheiden. Weitere Studien könnten dazu beitragen, die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen oder genauer zu definieren.

5.10. Ausblick auf weitere Forschung und weitere Untersuchungen

Es gibt vermutlich keine Forschungsarbeit, die Anspruch auf absolute Vollständigkeit erhebt. Somit ist fast jede Studie ein Sprungbrett für weitere Forschung und ermöglicht es, Ideen für weitere Untersuchungen zu finden.

Eine der ersten Gedanken bei einer explorativen Untersuchung mit leicht eingeschränkter Stichprobengröße ist selbstverständlich, eine weitere Forschungsarbeit mit mehr Studienteilnehmern durchzuführen. Eine solche Arbeit wäre in der Lage, den Ergebnissen

eine noch höhere Validität zu geben und noch kleinere Effekte abzubilden. In einer Forschungsarbeit mit einer noch größeren Stichprobe könnte es gegebenenfalls auch möglich sein, eine verbesserte Auswahl der Kontrollgruppe und der POWG-Gruppe durchzuführen, sodass eine Abweichung der Altersdurchschnitte geringer als in dieser Untersuchung ausfällt. Im Rahmen einer größeren Studie fallen eventuell mehr Proben an, bei denen gegebenenfalls eine PCR-Analyse der mRNA von MK der Zellen des TM durchgeführt werden kann. Eine so nachgewiesene MK-Expression der Zellen des Trabekelmaschenwerkes würde den genauen Pathomechanismus des Glaukoms näher beleuchten und gegebenenfalls die Fremd-Midkine-Hypothese komplett entkräften.

Eine alternative Möglichkeit, eine weitere Forschungsarbeit durchzuführen wäre, auf die Größe der einzelnen Midkine-Werte und Schweregrade der Offenwinkelglaukome einzugehen. In dieser Studie konnte lediglich eine statistisch signifikante Korrelation von Midkine gegenüber POWG gefunden werden, es wurde jedoch nicht auf den Effekt unterschiedlich großer Werte eingegangen. Dadurch ergibt sich eine vielversprechende Möglichkeit einer weiteren Untersuchung. In einer solchen erweiterten Forschungsarbeit könnte der Schweregrad der unterschiedlichen Offenwinkelglaukome mit der Höhe der Midkine-Werte verglichen werden und untersucht werden, ob ein höherer Midkine-Wert mit einem größeren Schweregrad im Zusammenhang steht. Auch kann in diesem Zusammenhang eine ausgeweitete Analyse der Prognose der untersuchten POWG Patienten durchgeführt werden. Es könnte ebenfalls von Interesse sein, die Augen von Patienten mit besonders stark abweichenden Midkine-Werten genauer zu untersuchen und die zugrunde liegenden Pathologien zu eruieren.

Es wäre außerdem interessant, neben einer größeren Untersuchung von Midkine-Werten in der Vorderkammerflüssigkeit, zusätzlich Werte für das Zytokin TGF- β zu erfassen. Da eine Korrelation von TGF- β und Midkine bereits in einigen Studien nachgewiesen wurde und TGF- β in anderen Geweben bisher eine Wirkung gezeigt hat, die mit einem Offenwinkelglaukom theoretisch konsistent ist, würde dies möglicherweise ein deutlich besseres Verständnis für die Pathogenese des POWGs ermöglichen.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung von MK in Proben des Kammerwassers könnte außerdem eine Untersuchung von MK im Blut oder auch der Tränenflüssigkeit der Studienteilnehmer ein mögliches Ziel einer weiteren Analyse darstellen. Sollte ein solcher Zusammenhang gefunden werden, wäre sogar eine weitere Diagnostik des POWGs mittels Marker möglich. Die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis ist jedoch in diesem Fall sehr gering.

Von Interesse könnte ebenfalls eine Untersuchung der Verdickung und der vermehrten Ablage von Neumaterial am Trabekelmaschenwerk im Zusammenhang mit POWG und erhöhten MK-Werten, beziehungsweise erhöhten TGF- β Werten in Kammerwasserproben

sein. Auch eine mögliche Beobachtung oder ein Nachweis des epithelial-mesenchymalen Transitionsprozesses könnte in diesem Rahmen von Interesse sein. Wie bereits beschrieben sind dies mögliche Pathophysiologie-Theorien des POWGs, die mit solchen Untersuchungen weiter beleuchtet werden könnten.

Eine weitere, bereits zuvor beschriebene Untersuchung von Interesse wäre der Versuch, Midkine oder auch TGF- β artifiziell in Versuchsaugen einzubringen, um die Wirkung dieser Veränderung zu beobachten. Eine angedachte Möglichkeit wären hier Versuche an Organ on a Chip Augen oder Tierversuche. Dabei könnten unterschiedliche Konzentrationen der Zytokine und unterschiedliche Orte für das Hinzufügen untersucht werden. So könnten beispielsweise Veränderungen durch ein direktes Einbringen von MK direkt am Trabekelmaschenwerk, in die Vorderkammer oder auch in die Hinterkammer des Auges untersucht werden.

Bei weiteren Ergebnissen wäre eventuell auch der bereits beschriebene Versuch eines MK- oder TGF- β Blockers an Versuchsaugen eine Möglichkeit, die Pathophysiologie des POWGs weiter zu beleuchten. Hier wäre sogar die Entwicklung einer Therapie für die Behandlung von POWG denkbar.

Generell ist zu erkennen, dass diese Arbeit aufgrund der explorativen Natur lediglich den Grundstein für eine große Menge vielversprechender weiterer Forschung legt. Es stehen jedoch einige Möglichkeiten offen, die Pathophysiologie des Glaukoms umfassender zu verstehen und sogar die Chance, eine neue Therapiemöglichkeit zu erhalten, die die Ursache des Glaukoms frühzeitig aufhält.

6. Literaturverzeichnis

- [1] WHO | Global data on visual impairment in the year 2002. WHO. <https://www.who.int/bulletin/volumes/82/11/resnikoff1104abstract/en/> (accessed Oct 27, 2019).
- [2] Cook C, Foster P. Epidemiology of glaucoma: what's new? *Canadian Journal of Ophthalmology* 2012; **47**: 223–6.
- [3] Meyerhof M. `Alî at-Tabarî's ``Paradise of Wisdom'', one of the oldest Arabic Compendiums of Medicine. *Isis* 1931; **16**: 6–54.
- [4] Evangelho K, Mogilevskaya M, Losada-Barragan M, Vargas-Sanchez JK. Pathophysiology of primary open-angle glaucoma from a neuroinflammatory and neurotoxicity perspective: a review of the literature. *Int Ophthalmol* 2019; **39**: 259–71.
- [5] Nathan J. Hippocrates to Duke-Elder: an overview of the history of glaucoma. *Clinical and Experimental Optometry* 2000; **83**: 116–8.
- [6] Kapetanakis VV, Chan MPY, Foster PJ, Cook DG, Owen CG, Rudnicka AR. Global variations and time trends in the prevalence of primary open angle glaucoma (POAG): a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Ophthalmology* 2016; **100**: 86–93.
- [7] Boland MV, Ervin A-M, Friedman DS, *et al.* Comparative Effectiveness of Treatments for Open-Angle Glaucoma: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2013; **158**: 271–9.
- [8] Malihi M, Moura Filho ER, Hodge DO, Sit AJ. Long-term trends in glaucoma-related blindness in Olmsted County, Minnesota. *Ophthalmology* 2014; **121**: 134–41.
- [9] Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA. The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. *JAMA* 2014; **311**: 1901.
- [10] Sommer A. Doyne Lecture. Glaucoma: facts and fancies. *Eye (Lond)* 1996; **10 (Pt 3)**: 295–301.
- [11] Chen PP. Blindness in patients with treated open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 2003; **110**: 726–33.
- [12] Yanoff M, Duker JS. *Ophthalmology*. 2018.
- [13] Ross MH, Pawlina W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011.
- [14] Martin XD. Normal Intraocular Pressure in Man. *OPH* 1992; **205**: 57–63.
- [15] Bill A. Some aspects of aqueous humour drainage. *Eye (Lond)* 1993; **7 (Pt 1)**: 14–9.
- [16] Llobet A, Gasull X, Gual A. Understanding Trabecular Meshwork Physiology: A Key to the Control of Intraocular Pressure? *Physiology* 2003; **18**: 205–9.
- [17] Becker B, Neufeld AH. Pressure Dependence of Uveoscleral Outflow: *Journal of Glaucoma* 2002; **11**: 464.

- [18] Skalicky SE. Ocular and visual physiology: clinical application. 2016 <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4089331> (accessed March 28, 2021).
- [19] Zhang S. An atlas of histology. New York: Springer, 1999.
- [20] Overby DR, Stamer WD, Johnson M. The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium. *Exp Eye Res* 2009; **88**: 656–70.
- [21] Tamm ER, Fuchshofer R. What Increases Outflow Resistance in Primary Open-angle Glaucoma? *Survey of Ophthalmology* 2007; **52**: S101–4.
- [22] Rohen JW, Witmer R. Electron microscopic studies on the trabecular meshwork in glaucoma simplex. *Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol* 1972; **183**: 251–66.
- [23] J G, Dh J, P M, E L-D. Severity of optic nerve damage in eyes with POAG is correlated with changes in the trabecular meshwork. *J Glaucoma* 1997; **6**: 123–32.
- [24] Jakov T colorized by. Deutsch: Anatomie des Auges. 2008 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eye_scheme_multilingual.svg (accessed Jan 31, 2021).
- [25] Baudouin C, Kolko M, Melik-Parsadaniantz S, Messmer EM. Inflammation in Glaucoma: From the back to the front of the eye, and beyond. *Progress in Retinal and Eye Research* 2020; : 100916.
- [26] Quigley HA. Glaucoma: macrocosm to microcosm the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: 2662–70.
- [27] Shields MB. Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma? *Current Opinion in Ophthalmology* 2008; **19**: 85–8.
- [28] Organization WH. Global data on visual impairments 2010. *Geneva: World Health Organization* 2012.
- [29] R A Bourne R, A Stevens G, A White R, *et al.* Causes of vision loss worldwide, 1990–2010: a systematic analysis. *The Lancet Global Health* 2013; **1**: e339–49.
- [30] Lang GK, Esser J. Augenheilkunde, 5., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2014.
- [31] Höhn R, Pfeiffer N. Klassifikation, Genetik und Epidemiologie der Glaukome. *Klin Monbl Augenheilkd* 2017; **234**: 931–48.
- [32] Schuster AK, Wagner FM, Pfeiffer N, Hoffmann EM. Risikofaktoren für das Offenwinkelglaukom und Empfehlungen zur Glaukomfrüherkennung. *Ophthalmologe* 2020; **117**: 1149–60.
- [33] Poulsen PB, Buchholz P, Walt JG, Christensen TL, Thygesen J. Cost analysis of glaucoma-related-blindness in Europe. *International Congress Series* 2005; **1282**: 262–6.
- [34] Leske MC, Connell AMS, Wu S-Y, *et al.* Incidence of Open-Angle Glaucoma: The Barbados Eye Studies. *Archives of Ophthalmology* 2001; **119**: 89–95.
- [35] Kang JH, Willett WC, Rosner BA, Buys E, Wiggs JL, Pasquale LR. Association of Dietary Nitrate Intake With Primary Open-Angle Glaucoma: A Prospective Analysis From the

- Nurses' Health Study and Health Professionals Follow-up Study. *JAMA Ophthalmology* 2016; **134**: 294–303.
- [36]Shiose Y, Kitazawa Y, Tsukahara S, *et al.* Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey. *Jpn J Ophthalmol* 1991; **35**: 133–55.
- [37]Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; **121**: 2081–90.
- [38]Sommer A, Tielsch JM, Katz J, *et al.* Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1991; **109**: 1090–5.
- [39]Coffey M, Reidy A, Wormald R, Xian WX, Wright L, Courtney P. Prevalence of glaucoma in the west of Ireland. *British Journal of Ophthalmology* 1993; **77**: 17–21.
- [40]Mitchell P, Smith W, Attebo K, Healey PR. Prevalence of open-angle glaucoma in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 1996; **103**: 1661–9.
- [41]Ramakrishnan R, Nirmalan PK, Krishnadas R, *et al.* Glaucoma in a rural population of southern India: the Aravind comprehensive eye survey. *Ophthalmology* 2003; **110**: 1484–90.
- [42]Buhmann RR, Quigley HA, Barron Y, West SK, Oliva MS, Mmbaga BB. Prevalence of glaucoma in a rural East African population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 40–8.
- [43]Iskedjian M, Walker J, Vicente C, *et al.* Cost of Glaucoma in Canada: Analyses Based on Visual Field and Physician's Assessment. *Journal of Glaucoma* 2003; **12**: 456–62.
- [44]Stefánsson E, Pedersen DB, Jensen PK, *et al.* Optic nerve oxygenation. *Progress in Retinal and Eye Research* 2005; **24**: 307–32.
- [45]Quigley HA, Addicks EM, Green WR, Maumenee AE. Optic Nerve Damage in Human Glaucoma: II. The Site of Injury and Susceptibility to Damage. *Arch Ophthalmol* 1981; **99**: 635–49.
- [46]Heijl A, Leske MC, Bengtsson B, *et al.* Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial. *Arch Ophthalmol* 2002; **120**: 1268–79.
- [47]Gordon MO, Beiser JA, Brandt JD, *et al.* The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2002; **120**: 714–20; discussion 829-830.
- [48]The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators. *Am J Ophthalmol* 2000; **130**: 429–40.
- [49]Cartwright MJ, Anderson DR. Correlation of asymmetric damage with asymmetric intraocular pressure in normal-tension glaucoma (low-tension glaucoma). *Arch Ophthalmol* 1988; **106**: 898–900.
- [50]Crichton A, Drance SM, Douglas GR, Schulzer M. Unequal intraocular pressure and its relation to asymmetric visual field defects in low-tension glaucoma. *Ophthalmology* 1989; **96**: 1312–4.

- [51] Quigley HA, West SK, Rodriguez J, Munoz B, Klein R, Snyder R. The prevalence of glaucoma in a population-based study of Hispanic subjects: Proyecto VER. *Arch Ophthalmol* 2001; **119**: 1819–26.
- [52] Foster PJ, Oen FT, Machin D, *et al.* The prevalence of glaucoma in Chinese residents of Singapore: a cross-sectional population survey of the Tanjong Pagar district. *Arch Ophthalmol* 2000; **118**: 1105–11.
- [53] Ramdas WD, Wolfs RCW, Hofman A, de Jong PTVM, Vingerling JR, Jansonius NM. Ocular Perfusion Pressure and the Incidence of Glaucoma: Real Effect or Artifact?: The Rotterdam Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011; **52**: 6875–81.
- [54] Alvarado JA, Yun AJ, Murphy CG. Juxtacanalicular Tissue in Primary Open Angle Glaucoma and in Nonglaucomatous Normals. *Archives of Ophthalmology* 1986; **104**: 1517–28.
- [55] Alvarado J, Murphy C, Polansky J, Juster R. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; **21**: 714–27.
- [56] Grierson I, Howes RC, Wang Q. Age-related changes in the canal of Schlemm. *Experimental Eye Research* 1984; **39**: 505–12.
- [57] Grierson I, Howes RC. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1987; **1**: 204–10.
- [58] Gabelt BT, Gottanka J, Lütjen-Drecoll E, Kaufman PL. Aqueous Humor Dynamics and Trabecular Meshwork and Anterior Ciliary Muscle Morphologic Changes with Age in Rhesus Monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 2118–25.
- [59] Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research* 2005; **24**: 612–37.
- [60] Last JA, Pan T, Ding Y, *et al.* Elastic Modulus Determination of Normal and Glaucomatous Human Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 2147–52.
- [61] Tielsch JM, Katz J, Sommer A, Quigley HA, Javitt JC. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 1994; **112**: 69–73.
- [62] Wolfs RC, Klaver CC, Ramrattan RS, van Duijn CM, Hofman A, de Jong PT. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol* 1998; **116**: 1640–5.
- [63] Stone EM, Fingert JH, Alward WL, *et al.* Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 1997; **275**: 668–70.
- [64] Rezaie T, Child A, Hitchings R, *et al.* Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 2002; **295**: 1077–9.
- [65] Fingert JH, Héon E, Liebmann JM, *et al.* Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations. *Hum Mol Genet* 1999; **8**: 899–905.
- [66] Souzeau E, Burdon KP, Dubowsky A, *et al.* Higher prevalence of myocilin mutations in advanced glaucoma in comparison with less advanced disease in an Australasian disease registry. *Ophthalmology* 2013; **120**: 1135–43.

- [67] Bonovas S, Peponis V, Filioussi K. Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis. *Diabetic Medicine* 2004; **21**: 609–14.
- [68] Zhao D, Cho J, Kim MH, Friedman DS, Guallar E. Diabetes, Fasting Glucose, and the Risk of Glaucoma: A Meta-analysis. *Ophthalmology* 2015; **122**: 72–8.
- [69] Cudowska MA, Wolfs RCW, Hofman A, Vingerling JR, Jansonius NM. Incidence of Glaucomatous Visual Field Loss in Offspring of Glaucoma Cases: A 10-Year Follow-Up from the Rotterdam Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010; **51**: 3979.
- [70] Crowston JG, Hopley CR, Healey PR, Lee A, Mitchell P. The effect of optic disc diameter on vertical cup to disc ratio percentiles in a population based cohort: the Blue Mountains Eye Study. *British Journal of Ophthalmology* 2004; **88**: 766–70.
- [71] Letterio JJ, Roberts AB. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β . *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 137–61.
- [72] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; **115**: 209–18.
- [73] Huggins JT, Sahn SA. Causes and management of pleural fibrosis. *Respirology* 2004; **9**: 441–7.
- [74] Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006; **69**: 213–7.
- [75] Tripathi RC, Li J, Chan WA, Tripathi BJ. Aqueous Humor in Glaucomatous Eyes Contains an Increased Level of TGF- β 2. *Experimental Eye Research* 1994; **59**: 723–8.
- [76] Inatani M, Tanihara H, Katsuta H, Honjo M, Kido N, Honda Y. Transforming growth factor- β 2 levels in aqueous humor of glaucomatous eyes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; **239**: 109–13.
- [77] Fleenor DL, Shepard AR, Hellberg PE, Jacobson N, Pang I-H, Clark AF. TGF β 2-Induced Changes in Human Trabecular Meshwork: Implications for Intraocular Pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 226–34.
- [78] Welge-Lüssen U, May CA, Lütjen-Drecoll E. Induction of Tissue Transglutaminase in the Trabecular Meshwork by TGF- β 1 and TGF- β 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 2229–38.
- [79] Sethi A, Mao W, Wordinger RJ, Clark AF. Transforming Growth Factor- β Induces Extracellular Matrix Protein Cross-Linking Lysyl Oxidase (LOX) Genes in Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 5240–50.
- [80] Gottanka J, Chan D, Eichhorn M, Lütjen-Drecoll E, Ethier CR. Effects of TGF- β 2 in Perfused Human Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 153–8.
- [81] Clark AF, Millar C, Pang I-H, Jacobson N, Shepard AR. Adenoviral Gene Transfer of Active Human Transforming Growth Factor- β 2 Induces Elevated Intraocular Pressure in Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 4771–4771.
- [82] Rodrigues MM, Katz SI, Foidart J-M, Spaeth GL. Collagen, Factor VIII Antigen, and Immunoglobulins in the Human Aqueous Drainage Channels. *Ophthalmology* 1980; **87**: 337–45.

- [83] Shaygannejad V, Montazeri S, Jamshidian A, *et al.* Correlation of Midkine Serum Level with Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Multiple Sclerosis. *Iranian Journal of Immunology* 2014; **11**: 134–8.
- [84] Misa K, Tanino Y, Wang X, *et al.* Involvement of midkine in the development of pulmonary fibrosis. *Physiological Reports* 2017; **5**: e13383.
- [85] Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad, Ser B* 2010; **86**: 410–25.
- [86] Li YS, Milner PG, Chauhan AK, *et al.* Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* 1990; **250**: 1690–4.
- [87] Merenmies J, Rauvala H. Molecular cloning of the 18-kDa growth-associated protein of developing brain. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16721–4.
- [88] Sato W, Kadomatsu K, Yuzawa Y, *et al.* Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* 2001; **167**: 3463–9.
- [89] Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation: Midkine in health and disease. *Pathology International* 2012; **62**: 445–55.
- [90] Sorrelle N, Dominguez ATA, Brekken RA. From top to bottom: midkine and pleiotrophin as emerging players in immune regulation. *J Leukoc Biol* 2017; **102**: 277–86.
- [91] Simon-Chazottes D, Matsubara S, Miyauchi T, Muramatsu T, Guénet JL. Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: midkine (Mdk) and basigin (Bsg). *Mamm Genome* 1992; **2**: 269–71.
- [92] Tomomura M, Kadomatsu K, Matsubara S, Muramatsu T. A retinoic acid-responsive gene, MK, found in the teratocarcinoma system. Heterogeneity of the transcript and the nature of the translation product. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10765–70.
- [93] Kaname T, Kuwano A, Murano I, Uehara K, Muramatsu T, Kajii T. Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1993; **17**: 514–5.
- [94] Uehara K, Matsubara S, Kadomatsu K, Tsutsui J, Muramatsu T. Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor. *J Biochem* 1992; **111**: 563–7.
- [95] Matsubara S, Tomomura M, Kadomatsu K, Muramatsu T. Structure of a retinoic acid-responsive gene, MK, which is transiently activated during the differentiation of embryonal carcinoma cells and the mid-gestation period of mouse embryogenesis. *J Biol Chem* 1990; **265**: 9441–3.
- [96] Fabri L, Maruta H, Muramatsu H, *et al.* Structural characterisation of native and recombinant forms of the neurotrophic cytokine MK. *J Chromatogr* 1993; **646**: 213–25.
- [97] Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, *et al.* Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* 1995; **121**: 37–51.

- [98] Kadomatsu K, Huang RP, Suganuma T, Murata F, Muramatsu T. A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* 1990; **110**: 607–16.
- [99] Satoh J, Muramatsu H, Moretto G, *et al.* Midkine that promotes survival of fetal human neurons is produced by fetal human astrocytes in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; **75**: 201–5.
- [100] Kikuchi S, Muramatsu H, Muramatsu T, Kim SU. Midkine, a novel neurotrophic factor, promotes survival of mesencephalic neurons in culture. *Neurosci Lett* 1993; **160**: 9–12.
- [101] Muramatsu T. Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. *Int J Dev Biol* 1993; **37**: 183–8.
- [102] Kadomatsu K. Midkine regulation of the renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 2010; **12**: 74–9.
- [103] Koide N, Hada H, Shinji T, *et al.* Expression of the midkine gene in human hepatocellular carcinomas. *Hepatogastroenterology* 1999; **46**: 3189–96.
- [104] Konishi N, Nakamura M, Nakaoka S, *et al.* Immunohistochemical analysis of midkine expression in human prostate carcinoma. *Oncology* 1999; **57**: 253–7.
- [105] Maeda S, Shintchi H, Kurahara H, *et al.* Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer* 2007; **97**: 405–11.
- [106] Ohhashi S, Ohuchida K, Mizumoto K, *et al.* Midkine mRNA is overexpressed in pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 2009; **54**: 811–5.
- [107] Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, *et al.* Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. *Neurosci Lett* 1997; **233**: 29–32.
- [108] Moon H-S, Park WI, Sung SH, Choi E-A, Chung H-W, Woo BH. Immunohistochemical and quantitative competitive PCR analyses of midkine and pleiotrophin expression in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2003; **88**: 289–97.
- [109] Nakagawara A, Milbrandt J, Muramatsu T, *et al.* Differential expression of pleiotrophin and midkine in advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1995; **55**: 1792–7.
- [110] Ren Y-J, Zhang Q-Y. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 2006–10.
- [111] Tsutsui J, Kadomatsu K, Matsubara S, *et al.* A new family of heparin-binding growth/differentiation factors: increased midkine expression in Wilms' tumor and other human carcinomas. *Cancer Res* 1993; **53**: 1281–5.
- [112] Xu Y, Qu X, Zhang X, *et al.* Midkine positively regulates the proliferation of human gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2009; **279**: 137–44.
- [113] O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, Bicknell R, Harris AL. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* 1996; **56**: 2515–8.

- [114] Kaifi JT, Fiegel HC, Rafnsdottir SL, *et al.* Midkine as a prognostic marker for gastrointestinal stromal tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; **133**: 431–5.
- [115] Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, *et al.* Correlation of elevated level of blood midkine with poor prognostic factors of human neuroblastomas. *Br J Cancer* 2003; **88**: 1522–6.
- [116] Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, *et al.* Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci* 2008; **99**: 2070–4.
- [117] Ye C, Qi M, Fan QW, *et al.* Expression of midkine in the early stage of carcinogenesis in human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; **79**: 179–84.
- [118] Navigieren Sie durch unsere MDK ELISA Kits. <https://www.antikoerper-online.de/rtk-signalweg-pathway-8/mdk-elisa-kit-17667/> (accessed April 23, 2020).
- [119] Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song XJ, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a Retinoic Acid-Inducible Heparin-Binding Cytokine in Inflammatory Responses: Chemotactic Activity to Neutrophils and Association with Inflammatory Synovitis. *J Biochem* 1997; **122**: 453–8.
- [120] Horiba M, Kadomatsu K, Nakamura E, *et al.* Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; **105**: 489–95.
- [121] Carter SB. Haptotaxis and the Mechanism of Cell Motility. *Nature* 1967; **213**: 256–60.
- [122] Wang J, Takeuchi H, Sonobe Y, *et al.* Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3915–20.
- [123] Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol* 2012; **3**: 117–36.
- [124] Takahashi E, Inoue T, Fujimoto T, Kojima S, Tanihara H. Epithelial mesenchymal transition-like phenomenon in trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 2014; **118**: 72–9.
- [125] Takei Y, Kadomatsu K, Matsuo S, *et al.* Antisense oligodeoxynucleotide targeted to Midkine, a heparin-binding growth factor, suppresses tumorigenicity of mouse rectal carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 8486–91.
- [126] Maruyama K, Muramatsu H, Ishiguro N, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; **50**: 1420–9.
- [127] Hobo A, Yuzawa Y, Kosugi T, *et al.* The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. *J Clin Invest* 2009; **119**: 1616–25.
- [128] Hayashi K, Banno H, Kadomatsu K, Takei Y, Komori K, Muramatsu T. Antisense oligodeoxyribonucleotide as to the growth factor midkine suppresses neointima formation induced by balloon injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005; **288**: H2203–9.
- [129] Yoshida Y, Ikematsu S, Moritoyo T, *et al.* Intraventricular administration of the neurotrophic factor midkine ameliorates hippocampal delayed neuronal death following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res* 2001; **894**: 46–55.

- [130] Unoki K, Ohba N, Arimura H, Muramatsu H, Muramatsu T. Rescue of photoreceptors from the damaging effects of constant light by midkine, a retinoic acid-responsive gene product. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35**: 4063–8.
- [131] Horiba M, Kadomatsu K, Yasui K, *et al.* Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* 2006; **114**: 1713–20.
- [132] Kanski JJ, Burk A, Burk R, Kanski JJ. Klinische Ophthalmologie: Lehrbuch und Atlas, 6., aktualisierte und erw. Aufl. München Jena: Elsevier, Urban & Fischer, 2008.
- [133] Schmitt JM. Optical coherence tomography (OCT): a review. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 1999; **5**: 1205–15.
- [134] Huang D, Swanson EA, Lin CP, *et al.* Optical Coherence Tomography. *Science* 1991; **254**: 1178–81.
- [135] Psomadakis CE, Marghoob N, Bleicher B, Markowitz O. Optical coherence tomography. *Clinics in Dermatology* 2021; **39**: 624–34.
- [136] Podoleanu AG, Rogers JA, Jackson DA, Dunne S. Three dimensional OCT images from retina and skin. *Opt Express, OE* 2000; **7**: 292–8.
- [137] Glaukom. Wikipedia. 2019; published online July 31. <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Glaukom&oldid=190916008> (accessed Aug 11, 2019).

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – „Schematische Darstellung der Anatomie und Physiologie des Glaukoms.“

Modifizierte und zusammengestellte eigene Abbildungen

einschließlich: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eye_scheme.svg, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Retina_layers.svg, Jakov T (2008). Deutsch: Anatomie des Auges. Darstellung des Abflussweges der Kammerwasserflüssigkeit (gestrichelter Pfeil).^[24]

Abbildung 2 – „Fortgeschrittene Aushöhlung der Papille mit ‚bajonettartiger‘

Tiefenabknickung der Gefäße“^[137]

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glaukompapille2.jpg#/media/Datei:Glaukompapille2.jpg> (11.08.2019).

Abbildung 3 – „Fortschreitende Gesichtsfeldausfälle (Skotome) des linken Auges in der OCTOPUS® Perimetrie im Zeitraum vom 02/2014 – 09/2017“ - Mit freundlicher Genehmigung Priv.-Doz. Dr. med. Robert Hörster.

Abbildung 4 – Normalverteilung in einer gaußschen Glockenkurve. Eigenes Bild mit Python generiert.

Abbildung 5 – Dotplot zweier Baseline-Kriterien; A: Niveau des intraokulären Drucks in mmHg bei verschiedenen Subgruppen unterschiedlicher Augenerkrankungen; B: Alter der verschiedenen Patienten unterschiedlicher Subgruppen in Jahren.

Abbildung 6 – QQ-Plot. Auftragung von erwarteten gegen tatsächliche Messwerte.

Abbildung 7 – Dotplot der Midkine-Konzentrationen in ng/ml von Proben unterschiedlicher Vorerkrankungen (Kontrollgruppe, primäres Offenwinkelglaukom, Makulaödem, Tamsulosineinnahme, Pseudoexfoliationssyndrom, neovaskuläre (späte) AMD, frühe AMD).
* Signifikante Erhöhung von Midkine-Spiegeln im Kammerwasser von Glaukompatienten, keine Erhöhung bei anderen Augenerkrankungen (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$).

Abbildung 8 – QQ-Plot. Auftragung von erwarteten gegen tatsächliche Messwerte.

Abbildung 9 – Dotplot der Midkine Konzentrationen in ng/ml im Kammerwasser von Patienten mit POWG- und Kontrollpatienten.

** signifikanter Unterschied (Signifikanzniveau $p \leq 0,01$).

Abbildung 10 – Mikroskopische Abbildung (1:100) einer immunhistochemischen Färbung eines Bulbus oculi (Auge) eines Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom. Dargestellt sind Gewebestücke des Trabekelmaschenwerks (TM), welche auf Midkine (braun) angefärbt wurden (an den mit * markierten Stellen).

Abbildung 11 – Mikroskopische Abbildung einer immunhistochemischen Färbung des Kammerwinkels eines Bulbus oculi (Auge) ohne Glaukomerkrankung, welches durch Eukleation gewonnen wurde. Am Trabekelmaschenwerk (TM) lässt sich keine Midkine-Färbung nachweisen.

7.2. Beigefügte Materialien

Anbei ist das Protokoll des verwendeten Immunoassays der Firma PeproTech „Human Midkine ELISA Development Kit 900-K190 Lot# 0206190“ zu finden.



Princeton Business Park, 5 Crescent Ave., P O Box 275
Rocky Hill, NJ 08553 USA
Tele: 609.497.0253 Fax: 609.497.0321
www.peprotech.com Email: info@peprotech.com

**Human Midkine
ELISA Development Kit
900-K190 Lot# 0206190
Expiration one year from date of receipt**

Description: Human Midkine ELISA development kit contains the key components required for the quantitative measurement of natural and/or recombinant hMidkine in a sandwich ELISA format within the range of 32-2000pg/ml. Using the ELISA protocol described below, the recommended microplates, reagents and solutions, the components supplied in this kit are sufficient to assay hMidkine in approximately 1000 ELISA plate wells.

RECONSTITUTION & STORAGE

Capture Antibody: 100µg of antigen-affinity purified rabbit anti-hMidkine + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1.0ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Detection Antibody: 100µg of biotinylated antigen-affinity purified rabbit anti-hMidkine + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1.0ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Human Midkine Standard: 1µg of recombinant hMidkine + 2.2mg BSA + 11.0mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 1µg/ml.

Note: The reconstituted components are stable for 2 weeks when stored at 2-8°C. Components that have been reconstituted and aliquoted can be stored at -20°C for up to 6 months.

Avidin-HRP Conjugate: 60µl vial. Upon receipt, avidin-HRP conjugate should be aliquoted into ten 6µl vials and stored at ≤-20°C. Aliquots stored frozen at ≤-20°C are stable for up to 2 years from date of receipt. Avoid more than one freeze-thaw cycle. **Avidin should be used in conjunction with ABTS only.**

**RECOMMENDED MATERIALS (or purchase
PeptoTech's ELISA Buffer Kit: Cat.# 900-K00)**

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454, or Corning Prod # 3590);
Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);
BSA (Sigma Cat # A-7030);
ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219);
Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. # 14200-075).

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water.

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS

Block Buffer: 1% BSA in PBS *

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS *

*** Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week.**

PLATE PREPARATION

1. Dilute capture antibody with PBS to a concentration of 1.0µg/ml. Immediately, add 100µl to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.

2. Aspirate the wells to remove liquid and wash the plate 4 times using 300µl of wash buffer per well. After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.
3. Add 300µl block buffer to each well. Incubate for at least 1 hour at room temperature.
4. Aspirate and wash plate 4 times.

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: dilute standard from 2ng/ml to zero in diluent. Immediately add 100µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute detection antibody in diluent to a concentration of 1.0µg/ml. Add 100µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin-HRP Conjugate: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute 5.5µl of avidin-HRP conjugate 1:2000 in diluent for a total volume of 11ml. Add 100µl per well. Incubate 30 minutes at room temperature.

ABTS Liquid Substrate:

(ABTS Substrate should be at ambient temperature prior to use)

Aspirate and wash plate 4 times. Add 100µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when either O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.4 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5-minute intervals for approximately 40 minutes. *O.D. readings may vary.*

CROSS REACTIVITY

When tested at 50ng/ml the following antigens exhibited less than 1% cross reactivity:

Human PTN

When tested at 50ng/ml the following antigens did not exhibit significant cross reactivity:

Human Artemin, β-NGF, BDNF, GDNF, Neurturin, NT-3, NT-4, Persephin

