

Aus der Augenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss von Angiotensin II auf die Endothelfunktion in der Arteria ophthalmica der Maus

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Michael Birk aus Reutlingen

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 28.02.2024

Meiner Frau und meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1. Physikalische Grundlagen der Gefäßtonusregulation.....	3
2.2. Anatomische Grundlagen der Blutversorgung des Auges	5
2.3. Detaillierte Darstellung der endothelabhängigen vasodilatativen Mechanismen	7
2.4. Oxidativer Stress	10
3. Material.....	23
3.1. Versuchstiere.....	23
3.2. Chemikalien.....	23
4. Methoden.....	27
4.1. Kryoschnitte und Dihydroethidium (DHE)-Färbung	27
4.2. Immunfluoreszenz-Färbung	28
4.3. Funktionelle Experimente	28
4.4. PCR	36
4.5. Statistik.....	38
5. Ergebnisse.....	38
5.1. Quantifizierung der ROS-Produktion mit Hilfe der DHE-Färbung	38
5.2. Funktionelle Experimente	39
5.3. NOX-Typisierung.....	48
6. Diskussion	50
6.1. Angiotensin II verursacht oxidativen Stress in der Gefäßwand der Arteria ophthalmica.....	50
6.2. Oxidativer Stress resultiert in einer reduzierten Vasodilatation aufgrund endothelialer Dysfunktion	54

6.3. Angiotensin II-vermittelter oxidativer Stress wird in der A. ophthalmica durch den AT ₁ -Rezeptor vermittelt	55
6.4. Durch Angiotensin II-vermittelter oxidativer Stress verursacht eine erhöhte Expression von NOX2 in der Gefäßwand.....	56
6.5. Oxidativer Stress und die Rolle von NO und der Prostaglandine in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen der murinen A. ophthalmica.....	57
6.6. Oxidativer Stress und die Rolle von EDHF in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen .	59
6.7. Relevanz und Einordnung der Ergebnisse in bisherige Forschungsergebnis	61
7. Zusammenfassung	64
7.1. Methode im Vergleich zu anderen Methoden.....	64
7.2. Ausblick auf Pharmakologische Therapie- und Interaktionsmöglichkeiten sowie bisherige Therapieversuche am Auge.....	65
7.3. Mögliche Ergänzungen? Aus Ergebnissen resultierende Fragestellungen	67
7.4. Abschluss.....	69
8. Anhang	70
8.1. Danksagung	70
8.2. Tabellarischer Lebenslauf.....	71
8.3. Erklärung zur Eigenständigen Verfassung.....	72
9. Literaturverzeichnis.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung Verlauf der A. ophthalmica	6
Abbildung 2: Präparation der A. ophthalmica. Hier Entfernung umgebendes Muskel- und Knochengewebe	29
Abbildung 3: Präparierte A. ophthalmica mit abgehenden Ästen.....	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung Versuchsaufbau der funktionellen Experimente.....	31
Abbildung 5: Ende eines Gefäßes, fixiert mittels 10-0 Faden und kanüliert auf eine Glaskanüle.....	32
Abbildung 6: Kanüliertes Gefäß während funktionellem Experiment. Links in kontrahiertem, rechts in dilatierem Zustand abgebildet.....	32
Abbildung 7: A) Abbildung Gefäßschnitte nach DHE-Färbung; B) grafische Darstellung der Leuchtintensität.....	38
Abbildung 8: Versuchsreihe mit Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen von Ang II. Die Versuchsreihen wurden jeweils mit einer Kontrollmedium und 3 verschiedenen Medien mit Ang II, jeweils in aufsteigenden Konzentrationen, durchgeführt.....	39
Abbildung 9: Versuchsreihe mit AT ₁ -Rezeptorblocker (Abb. 8A) und AT-2-Rezeptorblocker (Abb. 8B) jeweils Kontrollmedium gegen Ang II- inkubierte Gefäße	40
Abbildung 10: Versuchsreihe mit nicht-Isoformselektivem NOS-Inhibitor L-NAME	41
Abbildung 11: Versuchsreihe mit nicht-Isoformselektivem COX-Inhibitor	42
Abbildung 12: Versuchsreihe mit Blockade aller bekannten vasodilatativen Wege an der A. ophthalmica mit Ausnahme des EDHF-Weges	43
Abbildung 13: Blockade aller bekannten vasodilatativen Wege an der A. ophthalmica	44
Abbildung 14: Untersuchung der CYP450 abhängigen EDHF-Mechanismen	45
Abbildung 15: Untersuchung der LOX-abhängigen EDHF-Mechanismen	46
Abbildung 16: Untersuchung der Beteiligung von Hyperoxide. Vergleichend endothelunabhängige (A) gegen endothelabhängige (B) vasodilatative Mechanismen	47
Abbildung 17: Säulendiagramm Darstellung Zunahme NOX-RNA nach Inkubation mit Ang II im Vergleich zur Kontrollgruppe	48
Abbildung 18: A) Abbildung Gefäßschnitte mit anti-NOX2-Antikörperfärbung; B) Säulendiagramm: Quantitative Auswertung der Leuchtdichte	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer-Sequenzen.....	25
Tabelle 2: Zusammensetzung Krebs-Henseleit Pufferlösung	25
Tabelle 3: Zusammensetzung High K ⁺ Krebs-Henseleit Lösung	26
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien bei funktionellen Experimenten	26
Tabelle 5: Apparative Ausstattung funktionelle Experimente.....	27

Abkürzungsverzeichnis

A.	lat. Arteria, Arterie
Ae.	lat. Arteriae, Arterien
Abb.	Abbildung
ACEI	Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren
ACh	Acetylcholin
ACTB	beta-actin-Gen, Marker im Rahmen der PCR
ADP	Adenosindiphosphat
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
Ang II	Angiotensin II
Ang II Rezeptor Typ 1	AT ₁ Rezeptor
Ang II Rezeptor Typ 2	AT ₂ Rezeptor
ARDS	engl. acute respiratory distress syndrome, akutes Lungenversagen
ATP	Adenosintriphosphat
AU	engl. arbitrary units, willkürliche Einheit
BP	engl. blood pressure, (arterieller) Blutdruck
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CNV	choroidale Neovaskularisation
COX	Cyclooxygenase
CYP-450	Cytochrom P450-Enzym
DHE-Färbung	Dihydroethidium-Färbung
DNS, (engl. DNA)	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	lat. et alii, und andere
ET	Endothelin

ET-1	Endothelin-1
ETB	Endothelin Rezeptor Typ B
EDCF	endothelialer Cyclo-Oxygenase-abhängiger Kontraktionsfaktor
EDRF	engl. endothelium-derived relaxing factor = NO Endothelabhängiger Entspannungsfaktor
EDHF	engl. endothelium-derived hyperpolarizing factor Endothelabhängiger Hyperpolarisierender Faktor
EET's	Epoxyeicosatriensäuren
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ggf.	gegebenenfalls
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H+	Wasserstoffion
HETE's	engl. hydroxyepoxyeicosatrienoic acids Hydroxyepoxyeicosatriensäuren
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IOP	engl. intraocular pressure, Augeninnendruck/ Intraokularer Druck
KCl	Kaliumchlorid
L-NAME	N-Nitroarginin Methylester
LOX	Lipoxygenase
min	Minuten
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid Boten-Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Nf-kB	spezifischer Transkriptionsfaktor
NO	engl. nitric oxide, Stickstoffmonoxid = EDRF

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
NOX	NADPH-Oxidase
O ²⁻	Hyperoxid-Anion, früher Superoxid
OFB	engl. Ocular blood flow, okulärer Blutfluss
·OH	Hydroxyradikal
ONH	engl. optic nerve head, Sehnervenkopf
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OPP	engl. ocular perfusion pressure, okulärer Perfusionsdruck
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	engl. phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PGE-1	Prostaglandin E1
PGI ₂	Prostazyklin
PCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
POWG	primäres Offenwinkelglaukom
RAAS/ RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	engl. ribonucleic acid Ribonukleinsäure
ROS	engl. reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPE	retinale Pigmentepithelschicht
RT-PCR/ qPCR	Real-Time-PCR
RVP	retinaler Venendruck
s	Sekunden
SNP	engl. Sodium-Nitroprusside, Nitroprussid, exogenes Stickstoffmonoxid

THETA´s	engl. Trihydroxyeicosatrienoic acids, Trihydroxyeicosatriensäuren
U46619	Thromboxan-Analagon
u. a.	unter anderem
VECTASHIELD©	Markenname, Stabilisierungsmedium um Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoff zu verhindern
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor, endothelialer Gefäßwachstumsfaktor
ZAV	Zentralarterienverschluss
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

1. Einleitung

Mit zunehmendem Fortschritt der Medizin konnte die altersstandardisierte Prävalenz von Blindheit und Seheinschränkungen deutlich reduziert werden [1]. Durch die Fortschritte der modernen Medizin konnte die Lebenserwartung deutlich gesteigert werden, gleichzeitig sind aber Alterserkrankungen in den Vordergrund gerückt. Auch wenn die altersstandardisierte Prävalenz von Blindheit und Seheinschränkungen deutlich reduziert werden konnte, steigt die absolute Summe der Fälle bei steigender Lebenserwartung der Weltbevölkerung deutlich an [1]. In den Vordergrund rücken daher vor allem Krankheiten, die auf dem natürlichen Alterungsprozess des Menschen beruhen oder zu deren Risikofaktoren das Alter gehört. Hierzu gehören am Auge vor allem gut behandelbare Ursachen, wie nicht-korrigierte refraktive Fehler und die unbehandelte Katarakt im mittleren Alter. Im höheren Alter sind die Ursachen beispielsweise die altersabhängige Makuladegeneration (AMD), das Glaukom und die diabetische Retinopathie [2].

Pathophysiologisch rückt zunehmend die Rolle des oxidativen Stresses und die Regulation der Blutversorgung des Auges in den Fokus. Veränderungen im Blutfluss der Arteria (A.) ophthalmica konnten mit verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen bei oben genannten Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [3, 4]. Als Ätiopathogenese ist eine Schädigung der Neuronen durch unzureichende Sauerstoffversorgung der Retina zu nennen [5]. Bei Patienten mit Glaukom konnte ein erhöhter Flusswiderstand in der A. ophthalmica nachgewiesen werden. Entsprechend ist die retrobulbäre Durchblutung auch für die Genese des primären Offenwinkelglaukom POWG von wichtigem Forschungsinteresse [6].

Das Bild des Endothels als reine Barriere hat sich hin zu einem Verständnis der regulatorischen Funktion des Endothels verändert [7]. Eine Schlüsseleigenschaft ist hierbei die Regulation des Gefäßtonus und damit des Blutflusses. Durch den Alterungsprozess verändert sich auch die Endothelfunktion bis hin zu einer Endotheldysfunktion. Diese ist durch das verminderte Ansprechen gegenüber endothelabhängigen Vasodilatoren definiert [8]. Endotheldysfunktion ist mit Erkrankungen wie Atherosklerose, arterielle und pulmonale Hypertonie, Kardiomyopathien und Vaskulitiden [7] assoziiert und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen [9]. Endotheldysfunktion wird durch die kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie und Nikotinabusus [10] gefördert, insbesondere jedoch auch durch den Alterungsprozess [9]. Pathogenetisch wird dies mit verminderter Verfügbarkeit des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide, NO), oxidativem Stress und Entzündungsvorgängen in Zusammenhang gebracht [10]. Ein potenzieller therapeutischer Ansatz ist hierbei die Entwicklung von Medikamenten, um oxidativen Stress zu mindern.

Vaskuläre Dysfunktion durch oxidativen Stress wird auch durch Angiotensin II (Ang II) vermittelt [11]. Ang II ist vor allem als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) bekannt. Angiotensinogen wird durch das hauptsächlich im juxtaglomerulären Apparat der Niere produzierte Renin in Ang I umgewandelt. Durch das vor allem in Endothelzellen der Lunge produzierte Angiotensin-konvertierende Enzym wird Ang I in das gefäßaktive Ang II umgewandelt. Ang II wirkt in den peripheren Gefäßen vasokonstriktorisch und erhöht damit den Blutdruck. Durch Vermittlung einer Steigerung der Ausschüttung von Aldosteron und des antidiuretischen Hormons wird in der Niere mehr Wasser rückresorbiert. Renin wird sezerniert, wenn der renale Perfusionsdruck abfällt. Damit wird die Hauptaufgabe des RAAS als Teil der Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes und damit auch der Blutdruckregulation deutlich. Ang II kann aber über Aktivierung des Ang II Rezeptor Typ 2 (AT₂ Rezeptor) die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) in glatter Gefäßmuskulatur steigern. Dies wird als oxidativer Stress bezeichnet und führt zu einer Einschränkung der Gefäßfunktion. Dieser als vaskuläre Dysfunktion bezeichneter Effekt führt zu einer Fehlregulation des Blutflusses in nachgeordneten Versorgungsgebieten. Die Rolle der ROS bei der vaskulären Dysfunktion und die pathophysiologische Relevanz wird intensiv diskutiert und erforscht. In dieser Arbeit werden die Effekte von durch Ang II verursachtem, oxidativen Stress auf die Gefäßreaktivität der A. ophthalmica untersucht. Genutzt wurden sowohl funktionelle Experimente mit optischer Erfassung der Gefäßreaktivität auf gefäßaktive Substanzen als auch molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der Post-Rezeptormechanismen. Hierbei wurde das Mausmodell (C57 BL/6 J-Stamm) aufgrund der guten Eignung und der einfachen Verfügbarkeit gewählt. Die Maus weist zum humanen Organismus in vielen Gefäßgebieten Gemeinsamkeiten auf. Hier sind insbesondere die Verteilung von muskarinischen Rezeptoren im Körper [12-14] und die Rolle von NO bei der Vasodilatation [15] zu nennen.

In folgendem Kapitel werden die wissenschaftlichen Grundlagen bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit sowie der aktuelle Forschungsstand in verschiedenen Gefäßbetten beschrieben. Hieraus können Verbindungen zu den Ergebnissen der Arbeit gezogen werden und diese im Verlauf im Zusammenhang diskutiert werden.

2. Literaturdiskussion

2.1. Physikalische Grundlagen der Gefäßtonusregulation

Kleine arterielle Blutgefäße werden auch Widerstandsgefäße genannt, da sie den Flusswiderstand durch Kontraktion erhöhen können. Hierbei handelt es sich vor allem um terminale Arterien und Arteriolen. Hierdurch bietet sich dem Organismus die Möglichkeit Perfusionsschwerpunkte zu legen.

Der Blutfluss in der Mikrozirkulation entspricht einer laminaren Strömung [16]. Aus dem Hagen-Poiseuille-Gesetz mit dem ohmschen Gesetz ergibt sich folgender Grundsatz:

„Der Strömungswiderstand ist umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius.“

Hieraus lässt sich ableiten, dass bereits eine kleine Veränderung des Gefäßradius den Strömungswiderstand stark erhöht. Dies ist die physikalische Grundlage sowohl der physiologischen Regulation der Durchblutung als auch das pathophysiologische Erklärungsmodell für die koronare Herzkrankheit bei Verengung des Gefäßdurchmessers durch eine Stenose. Arteriolen und kleine Arterien sind für die Regulation des Blutdrucks verantwortlich, da Sie für den Großteil des peripheren Widerstandes und Blutflusses sorgen. Ein eindrückliches Beispiel hierfür ist die zerebrale Vasokonstriktion mit konsekutiver zerebraler Hypoxie und Benommenheit bei Hypokapnie.

Die physiologische Regulation des Gefäßdurchmessers in Widerstandsgefäßen richtet sich auch nach der Größe der Gefäße. An den kleinsten präkapillaren Arteriolen wirken vor allem humorale und metabolische Einflüsse, während an kleinen Arterien und größeren Arteriolen die neurogene Steuerung überwiegt. Die neurogene Steuerung wirkt vor allem vasokonstriktorisch und weniger vasodilatatorisch und sorgt so für einen andauernden Gefäßtonus, dem bei erhöhtem Bedarf vasodilatatorisch wirkende lokalchemische Mechanismen entgegenwirken.

2.1.1. Neurogene Steuerung

Die neurogene Steuerung des Gefäßtonus erfolgt über postganglionäre, sympathische Neurone und vor allem über die Freisetzung von Noradrenalin an α_1 -Adrenozeptoren. Die Wirksamkeit der neurogenen Stimulation hängt stark vom lokalen Milieu im Gewebe ab. Dies wird durch sogenannte Co-Transmitter wie Adenosintriphosphat (ATP), Neuropeptid Y, Ang II sowie Wasserstoffionen (H^+) beeinflusst. Das an den Nervenendigungen ausgeschüttete Noradrenalin gelangt nur in geringen Mengen in die Blutbahn, weshalb die Tonusänderung

lokal begrenzt bleibt. Sympathische Aktivierung sorgt in den peripheren Gefäßen für Vasokonstriktion. Parasympathische Aktivierung dagegen für Vasodilatation. Nur wenige Gefäße werden parasympathisch innerviert. Die parasympathische Aktivierung wird durch Acetylcholin (ACh) vermittelt und betrifft die Genitalorgane und die Speicheldrüsen. Neurogene Tonusminderung beruht in der Regel auf einer verminderten sympathischen Aktivierung [17].

2.1.2. Hormonelle Steuerung

Der wichtigste systemische hormonelle Regulator der Gefäßfunktion ist das Katecholamin Adrenalin, das bei starker sympathischer Erregung aus dem Nebennierenmark ausgeschüttet wird und an den Gefäßen in niedriger Konzentration über β_2 -Adrenozeptoren vasodilatierend und in höherer Konzentration über α_1 -Adrenozeptoren vasokonstriktorisch wirkt. Lokal wirksame Hormone werden auch als Autakoide bezeichnet und werden u. a. aus Makrophagen, Parenchymzellen der Gefäße und Endothelzellen freigesetzt. Reize hierfür sind vor allem mechanischer Art wie Scherstress im Endothel der Gefäßwand, die primäre Hämostase sowie entzündliche Vorgänge. Freigesetzte Substanzen sind z. B. Bradykinin oder die Arachidonsäuremetaboliten Prostazyklin und Thromboxan- A_2 .

2.1.3. Endothelzellen

Durch Endothelzellen werden lokal wirksame Autakoide freigesetzt. Der wichtigste vasodilatatorische Mediator ist das sehr kurzlebige Stickstoffmonoxid (NO), daher wird dies auch als Endothelabhängiger entspannender Faktor bezeichnet (engl. Endothelium-derived relaxing factor, EDRF). Es wird die durch Ca^{2+} / Calmodulin aktivierte endotheliale NO-Synthase freigesetzt (eNOS). Die Freisetzung wird durch Blutdruckschwankungen, äußere mechanische Einflüsse und durch die Wandschubspannung des strömenden Blutes aktiviert. Nach Diffusion in die glatte Gefäßmuskulatur wird die vasorelaxierende Wirkung durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase ausgelöst. Die endotheliale NO-Synthase kann auch durch viele weitere Agonisten und Antagonisten moduliert werden, wie Acetylcholin, Bradykinin und Endothelin[18].

Weitere physiologisch wichtige endotheliale Modulatoren sind Prostazyklin (PGI_2) und EDHF (engl. Endothelium-derived hyperpolarizing factor). Hierbei handelt es sich um einen Überbegriff von mehreren, teils noch nicht vollständig erforschten, hyperpolarisierenden und damit vasodilatierenden Faktoren. Hiervon sind vor allem die Arachidonsäuremetaboliten Epoxyeicosatrienate (EET's) zu nennen.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Blutversorgung an die lokale Stoffwechselaktivität angepasst. Dies erfolgt durch die mechanische Komponente, aber auch durch Wirkung lokalchemischer Stoffwechselmetaboliten. Diese Metaboliten sind die Nucleotide ADP, AMP und Adenosin sowie die Zu- oder Abnahme des PCO_2 im Blut.

Der endothelabhängige vasokonstriktorische Hauptregulator sind Endotheline, die aufgrund ihrer langen Halbwertszeit jedoch vor allem für die langfristige Tonusregulation wichtig sind. Vasokonstriktorische Eigenschaften werden auch Sauerstoffradikalen (v.a. Hyperoxidanionen) zugeschrieben. Ein bekanntes Beispiel hierzu ist der Bayliss-Effekt als eine autonome Regulation. Durch die mechanische Dehnung der glatten Muskelzellen werden auf zellulärer Ebene mechanosensitive Kanäle aktiviert, welche zu einer aktiven Tonusänderung führen. Diese nutzt der Körper z. B. für die Regulation der Durchblutung der Vasa afferentia der Niere und der lokalen Durchblutungsregulation bei Änderung der Körperlage (orthostatische Regulation) [17].

Ein Erklärungsansatz für Perfusionsstörungen ist die endotheliale Dysfunktion, die als Störung der normalen Endothelfunktion definiert wird. Daraus ergibt sich eine Störung sowohl der endothelabhängigen Vasodilatation als auch eine erhöhte Wandpermeabilität und eine vermehrte thrombogene Expression von Adhäsionsmolekülen. Durch daraus resultierende Thrombenbildung, Leukozytenadhäsion und Monozyteneinwanderung wird auch die Entstehung von Arteriosklerose gefördert [17].

2.2. Anatomische Grundlagen der Blutversorgung des Auges

Das Gehirn ist im Verhältnis zur Masse dasjenige Organ, welches am meisten Energie verbraucht. Das Auge ist embryologisch gesehen eine Ausstülpung des Gehirns und ist somit hiervon keine Ausnahme. Retinales Gewebe ist das am meisten metabolisch aktive Gewebe im Körper [19]. Der Blutfluss wird im engen Rahmen, abhängig vom Bedarf, reguliert. Veränderungen des Augeninnendrucks, geänderte Blutgaszusammensetzungen oder Lichtstimulation konnten als Einflussfaktoren für signifikante Änderungen des Blutflusses und des Gefäßwiderstandes nachgewiesen werden [20].

Die arterielle Blutversorgung am Auge erfolgt durch die A. ophthalmica, die ein Ast der A. carotis interna ist. Alle das Auge versorgende Arterien sind Äste der A. ophthalmica. Die abzweigenden Äste sind die Zentralarterie, die kurzen und langen posterioren Ziliararterien sowie die anteriore Ziliararterie [21]. Die Retina selbst wird von der Zentralarterie (retinales System) und den kurzen posterioren Ziliararterien (uveales System) versorgt. Das innere Drittel der Netzhaut wird vom retinalen System, und die äußeren beiden Drittel der Netzhaut vom uvealen System versorgt [21].

Das retinale Gefäßsystem zieht beim Menschen durch den Sehnerv und tritt als oberflächliches retinales System durch die Papille auf die Netzhaut ein. Dies sind die fundoskopisch sichtbaren oberflächlichen retinalen Arterien. Der Sehnervenkopf und ein Teil der Retina werden von den kurzen, fundoskopisch nicht sichtbaren, posterioren Ziliararterien versorgt.

Das uveale System versorgt die der Netzhaut außen anliegende, stark durchblutete Choroidea und damit die äußeren zwei Drittel der Netzhaut mit Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel [22].

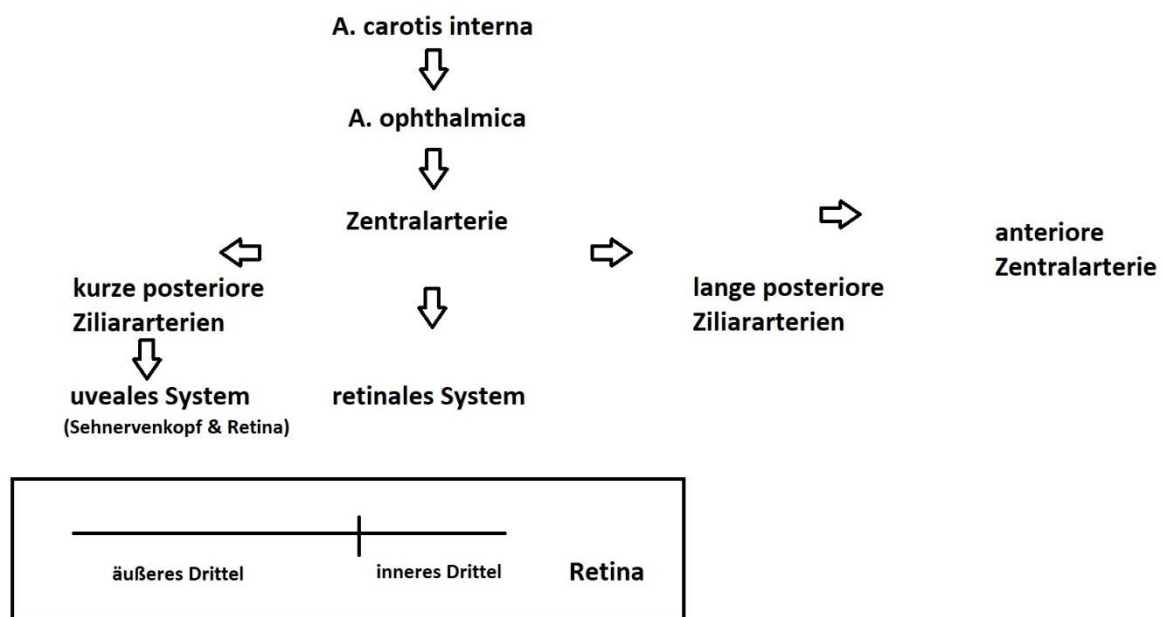


Abbildung 1: Schematische Darstellung Verlauf der A. ophthalmica

Die Steuerung des Gefäßtonus der retinalen Gefäße findet durch Autoregulationsmechanismen statt. Die retinalen Gefäße haben keine oder nur minimale autonome Innervation [21]. Die Zentralarterie wird dagegen autonom innerviert. An der Gefäßregulation der Zentralarterie sind parasympathische, sympathische und lokale trigeminale Mechanismen beteiligt [22]. Es gibt jedoch Hinweise, dass trigeminale afferente Fasern nicht in der Zentralarterie beim Menschen vorkommen [23]. Die Vasokonstriktion wird sympathisch durch α_1 -Adrenorezeptoren vermittelt. Die Vasodilatation wird hingegen parasympathisch durch stickstoffabhängige Mechanismen vermittelt [22].

Die Gefäße der Aderhaut werden durch das sympathische- und parasympathische Nervensystem reguliert. Die Aderhaut ist eines der am besten durchbluteten Gewebe des Menschen. Aufgrund des notwendigen hohen Stoffwechselumsatzes beim Sehen wird eine starke Durchblutung benötigt. Die Gefäßversorgung der Innenschichten der Netzhaut ist

aufgrund der für das Sehen notwendigen Transparenz der Netzhaut limitiert [24]. Die Regulation des Gefäßtonus der beiden Stromgebiete unterscheidet sich deutlich. Die Netzhautgefäße weisen keine Innervation auf, sondern werden allein durch Autoregulation gesteuert [25]. Es wird jedoch eine retinale neurovaskuläre Einheit diskutiert, wodurch eine Anpassung des retinalen Blutflusses an die metabolische Aktivität erfolgen kann [20].

Das Auge ist aus anatomischer Sicht ein Endstromgebiet, dadurch besteht im Falle eines Verschlusses keine Möglichkeit der Kompensation über Kollateralen. Die physiologische Regulation des Blutflusses ist somit besonders relevant. Besonders deutlich zeigt sich dies im Fall eines akuten Verschlusses der Zentralarterie (ZAV) mit daraus resultierendem dauerhaften Sehverlust. Auch gibt es Hinweise, dass okuläre Perfusionsstörungen an der Pathologie der altersabhängigen Makuladegeneration, der diabetischen Retinopathie, des Glaukoms und der nichtarteriitischen anterioren ischämischen Optikusneuropathie (NAION) beteiligt sind. Gezeigt wurde auch eine Begünstigung des Unterganges retinaler Ganglienzellen bei unzureichender Sauerstoffversorgung [26].

2.3. Detaillierte Darstellung der endothelabhängigen vasodilatativen Mechanismen

In bisherigen Experimenten wurden kleine Arterien bereits ausgiebig untersucht [11, 13, 27, 28]. Zur Vasoregulation der A. ophthalmica gibt es bisher wenige Studien. Dies ist vor allem der geringen Größe und ihrer schwierigen Zugänglichkeit in der Orbitahöhle geschuldet [29, 30]. Wie oben bereits beschrieben gibt es aber Hinweise auf eine pathophysiologische Rolle der Vasoregulation.

In der Erforschung der physiologischen Mechanismen der Vasoregulation der A. ophthalmica konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adrian Gericke bisher wichtige Mechanismen sowohl der Vasokonstriktion als auch der Vasodilatation am Mausmodell aufdecken [29]. Gezeigt werden konnten insbesondere die Mechanismen der Vermittlung der adrenergen Vasokonstriktion [31], der cholinergen Vasodilatation [13] sowie 2016 eine ausführliche Beschreibung der Postrezeptormechanismen unter physiologischen Bedingungen durch Manicam et al. [29].

In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf der endothelabhängigen Vasodilatation liegen, da diese durch oxidativen Stress an den Gefäßen, wie er im Rahmen verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen vorkommt, besonders beeinträchtigt wird. Die Mechanismen der endothelvermittelten Vasodilatation werden folgend beschreiben.

Bisher wurde gezeigt, dass ACh in der A. ophthalmica der Maus über den muskarinischen M₃-ACh-Rezeptor-Subtyp eine endothelabhängige Vasodilatation vermittelt [32, 33]. In Laborexperimenten ist diese sehr ausgeprägt und wiederholt auslösbar. Die Bedeutung des Endothels wird klar, wenn man es entfernt. Dies führt zu einer Aufhebung der ACh-abhängigen Vasodilatation in der A. ophthalmica. Diese ist durch eine endotheliale Abhängigkeit der cholinergen Vasodilatation erklärbar [29]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ACh als Agonist verwendet.

Zudem konnten an der A. ophthalmica der Maus bereits detaillierte Erkenntnisse zu den Postrezeptormechanismen der Vasodilatation gewonnen werden. Es handelt sich hierbei um NO-Synthase-abhängige Mechanismen (NOS) und Mechanismen, die eine Hyperpolarisation der Zellmembran einschließen. Diese nicht genau definierten Faktoren werden auch als endothelabhängige hyperpolarisierende Faktoren (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factors, EDHF'-s) bezeichnet. EDHF'-s sind unter anderem Arachidonsäure-Metabolite, die durch CYP450-Oxygenase und Lipoxygenase (LOX) umgewandelt werden. Anders als in den meisten anderen Gefäßbetten konnte bisher an der A. ophthalmica der Maus kein Hinweis für eine Beteiligung von Cyclooxygenase-abhängigen Mechanismen (z. B. Prostazyklin) an der endothelvermittelten Vasodilatation gefunden werden. Eine direkte Beteiligung von Kalium-Kanälen wurde bereits diskutiert [29].

2.3.1. NOS

Durch Aktivierung des muskarinischen M₃-Rezeptors kommt es über Aktivierung der Phospholipase C und des Second-Messengers Inositoltriphosphat zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums. Die dadurch bedingte Aktivierung der endothelabhängigen NO-Synthase (NOS) führt zu einer vermehrten Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO). NO ist einer der wichtigsten und potentesten vasodilatativen Faktoren [8]. NO bindet an der glatten Muskelzelle an die lösliche Guanylatzyklase-Gruppe (sGC-Gruppe) und aktiviert dadurch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) führt, die zur Absenkung des intrazellulären Kalziumspiegels und dadurch zur Vasodilatation führt.

Unter pathologischen Bedingungen kann die endotheliale NO-Synthase von der NO-Produktion (eNOS) „entkoppelt“ werden [34]. Die im vaskulären Endothel vorhandenen Synthasen sind die eNOS und nNOS, welche L-Arginin als Substrat verwenden, um NO zu produzieren [35]. Als Cofaktor hierfür ist jedoch Tetrahydrobiopterin (BH₄) essenziell. Ein Mangel hiervon führt zu einem fehlgeleiteten Elektronentransfer in der NO-Synthase wodurch das Radikal Hyperoxid (O²⁻) statt dem Vasodilatator NO produziert wird [34].

2.3.2. Arachidonsäuremetabolite

Nach Erstbeschreibung der Endothelabhängigkeit der muskarinischen Vasodilatation im Jahr 1980 durch Furchgott und Zawadzki [36] wurden endothelabhängige Mechanismen intensiv untersucht. Bald zeigte sich neben dem als NO identifizierten „endothelabhängigen erschlaffenden Faktor“ (endothelium derived relaxing factor (EDRF))[37] der Verbleib eines noch unbekanntes endothelabhängigen hyperpolarisierenden Faktors (endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF)) genannten Mechanismus[38]. Durch Erhöhung des intrazellulären Kalziums wird aus Fettsäuren durch Phospholipase A2 dann Arachidonsäure produziert. Hieraus werden in Folgeschritten die Mechanismen des EDHF produziert. Die Beschreibung der genauen Mechanismen des EDHF an der A. ophthalmica konnte 2016 durch Manicam et al. erfolgen [29].

- a) Durch CYP450-Oxygenase werden Arachidonsäuren zu Epoxyeicosatriensäuren (EET's) umgewandelt. Diese fungieren als Botenstoffe und Modulatoren der Gap Junctions, um die Durchlässigkeit der glatten Muskelzelle zu beeinflussen. Jedoch wirken sie auch als Botenstoffe, die die Kommunikation zwischen den Endothelzellen beeinflussen [39]. Es wurde auch die Möglichkeit eines EET-Rezeptors diskutiert [29]. EET's haben in der Regel eine vasodilatative Wirkung. Das CYP450-Produkt 20-HETE dagegen wirkt vasokonstriktorisch [40]. Bei Versuchen mit Ratten zeigte sich an Mikrogefäßen der Niere dagegen durch Ang II eine erhöhte Produktion von 20-HETE [41].
- b) Durch Lipoxxygenasen (LOX) werden aus Arachidonsäuren THETA's (trihydroxyeicosatrienoic acids) und 12S-HETE's (hydroxyepoxyeicosatrienoic acids) produziert [42]. Diese können aufgrund der großen Molekülgröße die Gap Junctions nicht passieren. Die endothelvermittelte Vasodilatation an der A. ophthalmica beinhaltet unter anderem die Aktivierung von Gap Junctions und dadurch eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle [29]. Eine genaue Spezifizierung der vasodilatativ wirkenden Substanz an der A. ophthalmica steht noch aus. Bisherige Ergebnisse zeigten eine Vasokonstriktion durch 12S-HETE und eine Wirkung als EDHF durch THETA's [40].

2.3.3. K_{ir} und $K_v1.6$ -Kanäle

Manicam et al. fanden 2016 in funktionellen Experimenten klare Hinweise für eine Beteiligung von K_{ir} und $K_v1.6$ -Kanälen an der ACh-vermittelten endothelabhängigen Vasodilatation an der A. ophthalmica. Histologisch konnten $K_v1.6$ -Kanäle in der glatten Muskulatur der A. ophthalmica der Maus nachgewiesen werden [29]. Vermutet wird eine Aktivierung durch den

Anstieg des extrazellulären Kalziums, wodurch es zu einer Hyperpolarisation und Vasodilatation kommt. In eNOS -/- Mäusen konnte in funktionellen Experimenten der Effekt von K_v -Kanälen jedoch nicht bestätigt werden [42]. Jedoch ergab sich auch hier ein Indiz auf die Beteiligung von K_{ir} -Kanälen. Gegebenenfalls liegt die Wirkung auch nur in Zusammenarbeit mit LOX-Metaboliten vor.

2.4. Oxidativer Stress

2.4.1. Einführung

Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde als erstes von H. Siess im Jahr 1985 als „eine Verschiebung des Gleichgewichts aus Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien“ beschrieben. Inzwischen liegt der Fokus der Erforschung vermehrt auf der physiologischen regulatorischen Funktion, dem Redox-Signaling. Man spricht von physiologischem Eustress und pathologischem Distress. Distress spielt hierbei durch Veränderung oder Schädigung von Biomolekülen (Lipide, Proteine und DNA) eine große pathophysiologische Rolle [43].

Als Oxidantien werden reaktive Verbindungen bezeichnet. Hierzu gehören sowohl Radikale, stabile chemische Verbindungen als auch stabile Verbindungen im elektronisch angeregten Zustand. Entsprechend besteht auch eine große Bandbreite in der chemischen Reaktivität der Verbindungen. Oxidantien können exogen und endogen entstehen. Exogene Quellen sind z.B. Tabak, Strahlung, Schadstoffe, Medikamente und Xenobiotika [43]. Endogen entstehende Oxidantien haben ihre Aufgaben sowohl im Rahmen des Redox-Signalings als auch in phagozytierenden Zellen. Wobei das Redox-Signaling den Hauptteil darstellt und daher für die physiologische Zellfunktion essenziell ist. Die wichtigste Gruppe der Oxidantien sind die reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS). Die Notwendigkeit, z. B. für die mitochondriale Energiegewinnung und gleichzeitig die potenzielle Schädigung durch die hohe Reaktivität von Sauerstoff wurde als das „Sauerstoff-Paradox“ bezeichnet [44].

ROS werden unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch Mitochondrien produziert. Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen Herstellung und Abbau von ROS. ROS werden v.a. durch Enzyme als auch durch Antioxidantien abgebaut. Kommt es durch exogene Zufuhr oder durch pathologische Situationen zu einem Überwiegen der ROS und damit oxidativem Stress, kann es zu einem Teufelskreis kommen. Durch oxidative Modifikation wichtiger Proteine kann es zu irreparablen Schäden und damit zu Apoptose oder Mutation des Genoms kommen. Diese Prozesse spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle beispielsweise in der Karzinogenese und dem Alterungsprozess.

Mit zunehmendem Alter verlieren Zellen ihre Fähigkeit zur selbstständigen Reparatur. Oxidativer Stress schädigt Zellen zusätzlich und beschleunigt den Alterungsprozess. Analog zur Zunahme des oxidativen Stresses im Alter steigen auch vaskuläre und endotheliale Dysfunktion im menschlichen Körper. Als ursächlich wird die genannte Abnahme von antioxidativen Enzymen im Alter gesehen. Über diesen Effekt hinaus könnte auch eine endotheliale Dysfunktion an der A. ophthalmica resultieren. Modrick et al. wies diesen Effekt bei Mäusen unterschiedlichen Alters bereits an der A. basilaris nach [45].

ROS spielen aber auch eine physiologische und regulatorische Rolle. Apoptose kann beispielsweise in der Immunabwehr (z. B. bei der Phagozytose in Makrophagen) physiologisch induziert werden. Fast alle Bereiche der zelleigenen Kommunikation werden durch ROS primär oder sekundär beeinflusst. Da fast alle Zellen Enzyme enthalten, die eine Umwandlung von Sauerstoff in ROS ermöglichen, wird von einer hauptregulatorischen Funktion der ROS ausgegangen [46]. Dies wird Redox-Signaling genannt und gewinnt in der Erforschung der zellinternen und intrazellulären Kommunikation zunehmend an Bedeutung.

2.4.2. Oxidativer Stress am Auge

Im Auge wird oxidativer Stress mit einer Vielzahl an Erkrankungen in Verbindung gebracht. Licht tritt durch die Medien des optischen Apparats und erzeugt dabei hohe Mengen an ROS. Andere Quellen können z. B. ein erhöhter Augeninnendruck oder eine Hyperglykämie sein [47]. Pathologischer oxidativer Stress wird am Auge mit Glaukom, Keratopathien, Katarakt, altersabhängigen Makulopathien und Retinopathien in Verbindung gebracht.

Zur Verdeutlichung werden kurz mehrere Einflüsse des oxidativen Stresses beim Glaukom beschrieben. Das Offenwinkelglaukom ist durch einen erhöhten Augeninnendruck aufgrund eines Ungleichgewichts der Produktion und des Abflusses von Kammerwasser gekennzeichnet. Das Kammerwasser fließt über das Trabekelwerk im Schlemmkanal ab. Der Schlemmkanal befindet sich im Kammerwinkel, dem peripheren Rand der Iris. Insbesondere hier besteht eine hohe andauernde Lichtstrahlung, wodurch der antioxidativen Funktion eine besondere Bedeutung zukommt. Pathophysiologisch zeigen sich Hinweise auf eine verminderte lokale antioxidative Aktivität als Schlüsselmechanismus [48], direkte DNA-Schädigung [49] und Überexpression von extrazellulären Matrixproteinen mit Einschränkung des Abflusses [46, 50].

2.4.3. Endotheliale Dysfunktion

Im weiteren Verlauf soll sich diese Arbeit auf die Beschreibung und Untersuchung von oxidativem Stress im Gefäßsystem und den Gefäßwänden konzentrieren. Oxidativer Stress wird mit vielen pathologischen Vorgängen in Gefäßen in Verbindung gebracht. Schon 1980 entdeckten Furchgott & Zawadzki [51] die Notwendigkeit des Endothels für die cholinerge Vasodilatation. Ein endothelabhängiger Relaxationsfaktor (EDRF) wurde beschrieben. Im Verlauf konnte das von Endothelzellen freigegebene Stickstoffmonoxid (NO) als EDRF nachgewiesen werden. Stickstoffmonoxid (NO) wird als solcher auch als Beschützer der Gefäßwand bezeichnet [8]. Das Freisetzungssignal erfolgt meist durch Scherstress, zirkulierende Hormone, Produkte der Thrombozyten oder Autakoide. Eine große Rolle wird NO vor allem an den Koronarien zugeschrieben. NO schützt vor Vasospasmen, hemmt die Plättchenaggregation, die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endothelzelloberfläche, die Adhäsion und Penetration von Makrophagen sowie die Freisetzung und vasokonstriktorische Fähigkeit von Endothelin-1. Im Falle einer ausbleibenden protektiven Wirkung kommt es zur Inflammation, die zu Arteriosklerose führen kann [8, 52]. Unter anderem durch den Verlust der Fähigkeit der Endothelzelle den Vasodilatator NO zu produzieren und dadurch bestehendem vasokonstriktivem Überhang entsteht endotheliale Dysfunktion. Diese ist assoziiert mit Einschränkungen der regulierenden Endothelfunktion, also Veränderung der endothelialen Barriere, einem Ungleichgewicht der vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren, der pro- und antikoagulativen Faktoren des Endothels sowie der Regulierung der Zellproliferation. Endotheliale Dysfunktion wird daher als prädiktiver Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gesehen [8].

2.4.4. Molekulare Mechanismen: Endotheliale Dysfunktion und oxidativer Stress

Es gibt mehrere Einflüsse, die eine Reduktion des Vasoprotektors NO unter oxidativem Stress bedingen. Diese und andere vasodilatativ wirkende Faktoren werden im Folgenden beschrieben:

- a) Eine der am besten erforschten Reaktionen der Verminderung von NO ist die chemische Reaktion zwischen NO und $O_2^{\cdot-}$. Hierbei entsteht das hochreaktive Radikal Peroxynitrit $ONOO^{\cdot-}$. Es handelt sich hierbei um eine der schnellsten bekannten chemischen Reaktionen [53]. Dadurch steht weniger vasodilatativ wirkendes NO zur Verfügung. Beispielsweise konnte in einem Tierversuch mit intermittierender Hypoxie eine reduzierte ACh-abhängige vasodilatative Antwort gezeigt werden. Unter exogener

Zufuhr von NO in Form von Nitroprussid (engl. sodium nitroprusside, SNP) konnte jedoch eine reguläre vasodilatative Antwort erzeugt werden [30].

Nebenbei entsteht bei oben beschriebener Reaktion das hochreaktive Nebenprodukt Peroxynitrit (ONOO⁻), das wiederum Zellschäden verursachen kann [54].

- b) Unter Physiologischen Bedingungen entsteht durch eNOS das Produkt Stickstoffmonoxid (NO). Unter pathologischen, v. a. unter persistierendem oxidativem Stress wird eNOS dysfunktional. Es entsteht eine eNOS-Entkopplung (engl. eNOS-uncoupling), wobei reaktive Sauerstoffverbindungen statt NO produziert werden. Gründe hierfür sind das Fehlen der eNOS-Cofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH₄), L-Arginine oder S-Glutathionyl [47]. Eine eNOS-Entkopplung konnte im Maus-Modell bei Atherosklerose, Hypercholesterinämie, Hypertension, Diabetes mellitus und chronischem Rauchen nachgewiesen werden.
- c) Im Tiermodell konnten durch intermittierende Hypoxie verursachte Genveränderungen am Sehnervenkopf gezeigt werden. Endothelinrezeptoren (ET_{RA} und ET_{RB}), eNOS und nNOS wurden hierbei höher exprimiert [30]. Dies kann unter pathologischen Bedingungen zerstörerische Effekte im Sinne einer Schädigung retinaler Ganglienzellen haben.
- d) Zu Beginn der Diabeteserkrankung kann eNOS, die permanent durch den Scherstress der laminaren Strömung aktiviert wird, noch für Vasodilatation sorgen. Später kann auch noch eine Kompensation durch Prostazyklin oder EDHF stattfinden. Im Verlauf überwiegen jedoch endothelabhängige kontrahierende Faktoren (engl. EDCF) oder ET-1 und damit die vasokonstriktive Komponente [55].
- e) In einem Tiermodell mit intermittierender Hypoxie, ähnlich einer Schlafapnoe, konnte eine verstärkte ET-1-abhängige Vasokonstriktion an der A. ophthalmica der Ratte nachgewiesen werden [30].

2.4.5. Angiotensin und oxidativer Stress

Angiotensin ist als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) an der Regulation des systemischen Blutdrucks, der Regulation des Gefäßtonus und der Volumenhomöostase beteiligt. Von dem in der Niere produzierten Enzym Renin wird Angiotensinogen durch verschiedene Enzyme auch in die vasoaktive Form Ang II umgewandelt. Ang II wirkt als potenter Vasokonstriktor [54] und steigert auch die Ausschüttung von Aldosteron in der Nebennierenrinde. Durch Aldosteron wird die Natrium- und Wasserretention in der Niere gesteigert. Im Hypophysenhinterlappen wird auch die Freisetzung des antidiuretischen Hormons bewirkt und damit die Wasserretention gesteigert. Durch beide zuletzt beschriebenen Effekte kommt es zu einer Zunahme des Plasmavolumens und dadurch einer

Zunahme des Blutdrucks [56]. Renin wird vermehrt ausgeschüttet, wenn der Perfusionsdruck der Nierenarterie fällt. Dieser gilt also als körpereigener Marker eines Volumenmangels. Eine Nierenarterienstenose und damit assoziiert, ein reduzierter Perfusionsdruck, kann zu einer sekundären arteriellen Hypertonie führen. Pharmakologisch kann durch Blockade von Teilen des RAAS eine Blutdrucksenkung erzeugt werden. Im klinischen Alltag sehr häufig genutzte Medikamentengruppe sind die seit 1994 genutzten Sartane, welche als Blocker des AT₁-Rezeptor wirken. Für systemisch zirkulierendes Ang II konnte auch eine pathophysiologische Seite aufgezeigt werden. Es konnte die Induktion von erhöhtem oxidativem Stress und die Minderung der endothelialen Funktion in verschiedenen Gefäßbetten nachgewiesen werden [57, 58]. Dieser Effekt wird vor allem mit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie des Umbaus der Herzwand nach einem Herzinfarkt oder manchen Formen von Bluthochdruck in Verbindung gebracht [59]. Hierfür möglicherweise pathologisch relevante Angiotensin-Rezeptoren konnten auch am Auge an den zuführenden Gefäßen und am Sehnervenkopf nachgewiesen werden [60, 61]. Die Effekte und die pathologische Relevanz hierfür müssen aber noch untersucht werden.

Neben dem systemisch wirkenden RAAS-System wurde ein lokal wirkendes RAAS in Gefäßwänden, am Herzen [62] aber auch am Auge beschrieben [61]. So konnte im Vergleich zu systemischen Arterien, an zerebralen Arterien auch eine deutlich höhere Produktionskapazität für ROS gezeigt werden [63]. Am Herzen ist die Rolle des RAAS bei pathologischen Strukturveränderungen bekannt [62]. Am Auge konnte, im Vergleich zu dem systemischen RAAS, gewebespezifisch deutlich erhöhte Spiegel an Ang II nachgewiesen werden. Am Schwein konnte am Auge in der Uvea, der Retina und der Aderhaut lokale Ang I- und II-Spiegel in Höhe des 5-100-fachen im Vergleich zum Blutplasma nachgewiesen werden. Im Glaskörper zeigte sich dagegen bei intakter Blut-Retina-Schranke nur ein Ang II-Spiegel in Höhe von 1 % der Menge im Plasma [61, 64]. Die retinale Hyperglykämie bei Diabetes mellitus konnte mit einer vermehrten Aktivierung des RAAS und vermehrter ROS-Produktion in Zusammenhang gebracht werden [61].

Dass Ang II die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in glatter Gefäßmuskulatur stimuliert, wurde bereits am Ende des letzten Jahrhunderts beobachtet [65]. Im Mausmodell konnte ein durch Ang II-induzierter proinflammatorischer Status nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich auch eine fundamentale Rolle für den Ang II-Rezeptor Typ 2 (AT₂) und die Abhängigkeit von NADPH-Oxidase 2 (NOX2) [66]. NOX ist das Enzym, welches mit Hilfe von NADPH Sauerstoff (O₂) zum ROS Hyperoxid-Anion (O₂⁻) reduziert. Hierbei infiltrieren Monozyten die Gefäßwand und steigern die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies in der Gefäßwand der Aorta der Maus [66]. An Zerebralarterien konnte dieser Effekt bestätigt werden. Hier werden durch Ang II vor allem NOX1 und NOX2 aktiviert, welche auch am

Gefäßendothel ausgebildet werden [54]. Die Hauptquelle von ROS ist hierbei NOX2. Beispielsweise konnte bei NOX2-defizienten (NOX2^{-/-})-Mäusen durch Ang II-Infusion keine Verstärkung der ROS-Produktion erzeugt werden [67]. Die Effekte werden mittels Angiotensin-Rezeptoren vermittelt. Bekannt sind bisher der AT₁- und der AT₂-Rezeptor. Ursprünglich wurden diese zu Beginn der 1990'-er-Jahre beschrieben. Über den AT₁-Rezeptor wirkt Ang II als potenter Vasokonstriktor [54]. Im Verlauf zeigte sich, dass der AT₁-Rezeptor und mehrere Signalmechanismen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren gemeinsame Signalwege nutzen. Hierdurch erklärt sich das kardiovaskuläre Remodeling mit Proliferation der kardialen Myozyten, der Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Die beschriebene Aktivierung von NOX und damit die Produktion von ROS wurde erst später entdeckt, und zeigte damit die Bedeutung als entzündlich wirkendes Zytokin [68].

Am Auge wird durch die oben beschriebenen Signalwege durch Ang II die vermehrte Produktion von ROS in retinalen Blutgefäßen und Müller-Zellen vermittelt, die zu vaskulärer Dysfunktion und Neurodegeneration führt [61, 69]. Der Hyperoxidanstieg [70] führt zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit. Hohe Mengen an zirkulierendem Ang II werden daher auch durch den Mangel des Vasodilatators NO für eine eingeschränkte Gefäßfunktion verantwortlich gemacht. Aber es konnten an den die Netzhaut und den Sehnervenkopf versorgenden Gefäßen auch Ang II-Rezeptoren nachgewiesen werden [60]. Gefäßantworten auf Ang II wurden an Blutgefäßen des Auges sowohl in vivo als auch in vitro von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht und nachgewiesen [71, 72]. Am Schweinemodell zeigte sich an den Ziliararterien durch den AT₁-Rezeptor eine Aktivierung der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen [73]. An den Perizyten der Netzhautgefäße zeigte sich durch Angiotensin eine Kontraktion und Migration bis hin zur Apoptose und Expression von Gefäßwachstumsfaktoren [74-77]. Weitere Experimente wiesen für Angiotensin einen verstärkenden Effekt auf die Angiogenese und Gefäßpermeabilität im Rahmen der diabetischen Retinopathie nach [78, 79]. Dagegen konnte durch Blockade des RAAS-Systems eine Verzögerung der Schrankenstörung und Gefäßneovaskularisation bei diabetischer Retinopathie gezeigt werden [80, 81]. Analog dazu konnte bei Blockade ein protektiver Effekt beispielsweise auf die Entwicklung von altersabhängiger Makuladegeneration und Glaukom gezeigt werden [61].

2.4.6. Oxidativer Stress und pathophysiologische Relevanz

2.4.6.1. Glaukom

Das Glaukom ist eine Gruppe an Erkrankungen, die durch charakteristische Veränderungen des Sehnervs charakterisiert sind. Dabei kommt es zur Aushöhlung des Sehnervenkopfes durch einen Untergang an Axonen und benachbarten Gliazellen sowie zu den krankheitstypischen Einschränkungen des Gesichtsfelds aufgrund des Verlustes retinaler Ganglienzellen, was letztendlich die Erkrankung Glaukom definiert [82]. Schätzungen gingen für 2020 von weltweit 79,6 Millionen betroffenen Menschen aus. Hiervon sind 11 Millionen Menschen beidseitig erblindet. Die beiden häufigsten Formen sind hierbei das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) und das Engwinkelglaukom, wobei ersteres etwa 7-mal häufiger als letzteres ist [83].

Beim POWG ist der Kammerwinkel, in dem physiologisch das Kammerwasser über den Schlemmkanal abfließt, weder verlegt noch verengt. Trotzdem ist der Augeninnendruck erhöht und führt somit zu einem Nervenzellverlust [84]. Etwa 50 % der Patienten mit Glaukom haben jedoch einen, als normal definierten, Augeninnendruck (IOP) von 10-21 mmHg [85]. Diese als Normaldruckglaukom bezeichnete Form ist schwer frühzeitig zu diagnostizieren, da in der Perimetrie Ausfälle erst bei Verlusten von mindestens 30 % der retinalen Ganglienzellen sichtbar werden [86].

Die Pathologie des POWG ist weiterhin nicht vollständig erforscht. Die Ursache ist multifaktoriell und teilweise auch genetischer Natur [87]. Grundsätzlich geht man von zwei Haupttheorien der Pathogenese aus: eine mechanische und eine vaskuläre Theorie der Schädigung wurden beschrieben. Die mechanische Theorie beschreibt durch den intraokularen Druck eine Dehnung der Nervenfasern und Schädigung der retinalen Ganglienzellen. Die vaskuläre Theorie legt den Schwerpunkt auf eine Schädigung durch insuffiziente Blutversorgung aufgrund erhöhtem intraokularem Druck oder andere, ebenfalls den okulären Blutfluss reduzierende Ursachen [88].

Jedoch scheinen auch die retrobulbären Durchblutungsverhältnisse Einfluss auf die Genese zu haben [87]. So konnte bei Glaukompatienten ein erhöhter Flusswiderstand der A. ophthalmica nachgewiesen werden [6]. Der intraokulare Druck konnte als entscheidender Faktor weder für die Gesichtsfeldausfälle noch für die Veränderungen der retrobulbären Durchblutungsverhältnisse nachgewiesen werden [6]. Es wurde auch mittels Iontophorese ein geringeres Vorkommen von ACh in peripheren Hautgefäßen bei Patienten mit POWG beschrieben [89]. Eine experimentelle Arbeit konnte im Mausmodell durch moderate

Augeninnendruckerhöhung die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion an retinalen Gefäßen zeigen [90]. Somit wäre auch die Induktion einer Durchblutungsstörung allein durch erhöhten Augeninnendruck denkbar.

2.4.6.1.1. Normaldruckglaukom

Im Folgenden geht diese Arbeit auf das Normaldruckglaukom ein, da hier die Durchblutungskomponente wahrscheinlich eine größere Rolle als im POWG mit erhöhten Augeninnendruckwerten spielt [88]. Entscheidend für die Sicherstellung der Blutversorgung ist der okuläre Perfusionsdruck. Als Berechnungsgrundlage hierfür dient folgende Formel:

Okulärer Perfusionsdruck (OPP) = arterieller Blutdruck (BP) – intraokularer Druck (IOP = retinaler Venendruck (RVP))

Eine Minderung des okulären Perfusionsdrucks gilt als prädiktiver Faktor einer Progression der glaukomatösen Optikusschädigung [91]. Hierfür verantwortlich gemacht wird vor allem ein nachts niedriger systemischer Blutdruck da hier eine veränderte Autoregulation und defekte Adaptationsmechanismen nachgewiesen werden konnten. Dies kann zu einer vaskulären Dysregulation führen, die wie folgt definiert ist: die Unfähigkeit Gewebe trotz Veränderungen im Perfusionsdruck ausreichend mit Blut zu versorgen. Die vaskuläre Dysregulation gilt als eine Schlüsselkomponente der Pathogenese der glaukomatösen Optikusneuropathie bei Normaldruckglaukom [4]. Bei Patienten mit einem Normaldruckglaukom konnte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine Zunahme des vaskulären Widerstandes gezeigt werden [92].

Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein konstant niedriger okulärer Blutfluss (OBF) weniger glaukomatöse Schädigung verursacht als Fluktuationen im OBF [88]. Dies unterstützend konnte beobachtet werden, dass 65 % der Patienten mit Normaldruckglaukom und Hypotonie auch Vasospasmen haben [93, 94]. Eine eingeschränkte vaskuläre Autoregulation wurde beim Normaldruckglaukom vermehrt bei Patienten mit einem progressiven Befund und weniger bei einem stabilen Befund beobachtet [95]. Nächtliche Blutdruckabsenkungen um >10 % im Vergleich zu tagsüber werden auch als Risikofaktor für eine Progression von Gesichtsfelddefekten gesehen [96].

Zusammenfassend beschrieben wurden diese Risikofaktoren als „Flammer-Syndrom“ (engl. vascular dysregulation syndrome). Zu diesem Komplex gehören Migräne, systemische Gefäßerkrankungen und endotheliale Dysfunktion. Pathophysiologisch relevant für eine Schädigung sind bei Migräne Vasospasmen. Bei systemischen Gefäßerkrankungen vermutet man eine Erhöhung des ET-1-Spiegels im Blutkreislauf. Einige Studien konnten auch erhöhte

Plasma-ET-1-Spiegel bei Patienten mit Normaldruckglaukom zeigen. Im Tierversuch konnte am Kaninchen durch intravenöse Gabe von ET-1 sowohl ein erniedrigter intraokularer Druck als auch eine Reduktion im Blutfluss am Sehnervenkopf gezeigt werden [97]. Die endotheliale Dysfunktion resultiert meist aus oxidativem Stress und Beeinflussung der protektiven vasodilatativen Wirkung des NO. Jedoch weisen Studien auch auf eine reduzierte Freisetzung von NO und eine erhöhte Sensitivität gegenüber ET-1 hin [98].

Als weiterer Risikofaktor für eine Progression wurde die Schlafapnoe beschrieben, da hier durch wiederholte Obstruktion der Atemwege eine Hypoxämie und Hyperkapnie verursacht wird. Die eigentliche glaukomatöse Schädigung beruht hierbei auf einem erhöhten Gefäßwiderstand durch die erhöhte Sympathikusaktivierung sowie auf dem durch die Ischämie-Reperfusion ausgelösten, oxidativen Stress und Entzündungsreiz. Langfristig kann auch dies durch Schädigung des Gefäßendothels zu einer endothelialen Dysfunktion und reduzierten Autoregulation führen [99]. Die Gefäßschädigung ist an den kurzen posterioren Ziliararterien lokalisiert. Diese versorgen den Sehnervenkopf (engl. optic nerve head = ONH) welcher am sensibelsten auf Veränderungen des Blutfluss und vaskuläre Dysregulation reagiert [100]. Beim Normaldruckglaukom entsteht die Schädigung durch Sauerstoffmangel und die dadurch erfolgte Hemmung des Elektronenflusses in den Mitochondrien mit begleitender Bildung von freien ROS und resultierender mitochondrialer Dysfunktion. Insgesamt führt dies zu einer schlechteren Energieversorgung nach Schädigung der Mitochondrien. Hierdurch bilden sich freie Radikale, die zu einer mitochondrialen Dysfunktion und Schädigung von DNA und anderen Zellproteinen führen. Letztendlich führt dies zu Apoptose der retinalen Ganglienzellen, entsprechend einer glaukomatösen Schädigung [101].

2.4.6.1.2 Autoregulation der Blutversorgung am Sehnervenkopf

Der intraokulare Blutfluss ergibt sich aus der Differenz des intrazerebralen und des intraokularen Druckes. Um unabhängig von Druckschwankungen eine möglichst stabile Blutversorgung zu sichern, haben sich an der Netzhaut und dem Sehnervenkopf autoregulative Mechanismen entwickelt. Man spricht inzwischen von einer „Neurovaskulären Einheit“ [102]. Die Neurovaskuläre Einheit reguliert die Vasoaktivität entsprechend den umgebenden autoregulativen Faktoren wie ET-1 und NO. Jedoch wird auch Einfluss auf den Erhalt der Blut-Gewebe-Barriere und die Immunität genommen. Pathophysiologisch sind vor allem die kurzen posterioren Ziliararterien relevant, da diese sehr sensitiv auf Veränderungen des Perfusionsdruckes und vaskuläre Dysregulation reagieren. Diese versorgen den Sehnervenkopf und die Aderhaut. Die Zentralarterie ist als Schädigungsort weniger im Fokus.

2.4.6.1.3 Oxidativer Stress und Glaukom

Obwohl nicht alle pathophysiologischen Mechanismen vollständig verstanden werden, wird ROS und endothelialer Dysfunktion eine Hauptrolle in der Pathophysiologie des Glaukoms zugeschrieben [91, 103]. Es konnte bei Glaukom-Patienten sowohl in Proben aus dem Glaskörper als auch dem Blutserum erhöhte Spiegel von ROS gemessen werden [104].

Der Glaukom-Haupttrisikofaktor, der erhöhte Augeninnendruck zeigte bereits bei moderater Erhöhung eine Induktion deutlich erhöhter ROS-Spiegel, eine vermehrte Expression von NOX2 und endotheliale Dysfunktion retinaler Arteriolen im Mausmodell [90]. Ein erhöhter intraokularer Druck konnte im Mausmodell bereits nach wenigen Stunden mit einer erhöhten ROS-Produktion assoziiert werden [105]. Interessanterweise zeigte sich die Entstehung in der Nähe von neuronalen Zellen beschleunigt. An retinalen Ganglienzellen zeigte sich eine Blockade des axonalen Transportes, eine Überwältigung der antioxidativen Kapazität und Stimulierung der glutaminergen Neurotoxizität. Es resultiert eine ischämische Schädigung der retinalen Ganglienzellen und der Gliazellen am Sehnervenkopf. Es wurden auch Hinweise auf eine erhöhte Antigenizität an Gliazellen mit T-Zell-Aktivierung am Sehnervenkopf beschrieben [103].

Oxidativer Stress hat an mehreren Orten Einfluss auf die Entwicklung des Glaukoms. Das Trabekelmaschenwerk ist durch die prominente Lage in der Vorderkammer z. B. chronischer UV-Belastung ausgesetzt. Hierdurch entsteht eine direkte Schädigung der trabekulären Endothelzellen. Das Trabekelmaschenwerk ist keine reine mechanische Barriere, sondern ein aktives Organ. Durch die Schädigung des Schlemm-Kanals und der assoziierten Kanäle entsteht hierbei eine Hemmung des Abflusses. Es konnte bei Glaukom-Patienten in Proben des Glaskörpers und des Serums eine Erniedrigung des antioxidativen Status gezeigt werden [104]. Jedoch wurde andererseits im Glaskörper auch ein Anstieg der antioxidativen Enzyme Hydroperoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase beschrieben [104].

Chronischer oxidativer Stress wird hier auch durch den Wechsel von Ischämie und Reperfusion (engl. ischemia reperfusion injury) verursacht. Ein bekanntes Beispiel ist die bereits genannte Schlafapnoe. Der chronische oxidative Stress wird in den lokalen Mitochondrien der retinalen Ganglienzellen und deren Axonen verursacht. Die daraus resultierende mitochondriale Dysfunktion führt bis hin zu Apoptose der retinalen Ganglienzellen [106]. Aber ein Tiermodell der Schlafapnoe mit intermittierender Hypoxie und daraus entstehender endothelialer Dysfunktion zeigte am Sehnerv auch eine erhöhte Genexpression von ET-Rezeptoren (ET_{RA} und ET_{RB}) sowie eNOS und nNOS. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht an retinalen Gefäßen. Endothelin-1 wird aufgrund seiner ET_{RA}-

vermittelten vasokonstriktiven Wirkung am Sehnervenkopf eine Beteiligung an der Pathophysiologie des Glaukoms zugeschrieben. Es wird aber auch eine verminderte ET_RB-vermittelte Vasodilatation und verspätete NO-vermittelte Vasorelaxation und ein Ungleichgewicht der CYP-450 vermittelten vasoaktiven Produkte diskutiert [30].

2.4.7. Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist weltweit die dritthäufigste Erblindungsursache nach der Katarakt und dem Glaukom [107]. In Industrieländern ist sie die Hauptursache des zentralen Visusverlustes [108]. Betroffen sind 10 % der >65-jährigen und 25 % der >75-Jährigen [109]. Hauptrisikofaktoren sind in erster Linie das zunehmende Alter und genetische Faktoren [108]. Der wichtigste vermeidbare Risikofaktor ist das Rauchen [110]. Ein erhöhtes Risiko konnte vor allem für die feuchte Form der AMD durch eine Katarakt-Operation in der Vorgeschichte nachgewiesen werden [111].

Die Erkrankung ist eine chronisch fortschreitende degenerative Erkrankung der Makula, welche durch eine fortschreitende Visusminderung aufgrund einer Neurodegeneration des retinalen Photorezeptor-Pigmentepithelkomplexes charakterisiert ist. Hieraus folgt eine geographische Atrophie oder choroidale Neovaskularisationen (CNV). Das retinale Pigmentepithel (RPE) besteht aus nicht-teilbaren Zellen, die viele essenzielle Funktionen für das Aufrechterhalten der Funktion von Photorezeptoren erfüllen. Während des Alterungsprozesses durchlebt das RPE viele Veränderungen die letztlich zu den klinisch sichtbaren gelblichen fokalen Ansammlungen von extrazellulärem, polymorphen Material führen. Diese als Drusen bezeichneten Ansammlungen befinden sich zwischen dem RPE und der inneren Zone der Bruch-Membran. Daher ist das Diagnostische Kennzeichen der AMD das Vorhandensein von Drusen in der Makula [108]. Die fortgeschrittenen Formen werden klinisch in die trockene atrophische oder die feuchte Form mit Neovaskularisationen unterschieden. Die trockene Form ist mit 85-90 % die deutlich häufigere Form und zeichnet sich durch Atrophie des RPE und dadurch fortschreitendem Visusverlust aus. Die feuchte Form hingegen (10-15 % der Fälle) wird durch das Wachstum von neuen Blutgefäßen charakterisiert. Diese neugebildeten, undichten und häufig rupturierenden Gefäße wachsen von der Aderhaut (Choroidea) ausgehend in die Bruch-Membran ein. Die normale Architektur des Photorezeptor-RPE-Komplexes wird dabei unterbrochen, was zu Narbenbildung führt [112]. Therapeutisch bildet hierbei die intravitreale Injektion von Hemmern des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), um die Gefäßneubildung zu verhindern, den aktuellen Standard der Therapie (Anti-VEGF-Therapie) [113].

Die Pathophysiologie der AMD ist immer noch nicht vollständig verstanden. Als ursächlich werden komplexe multifaktorielle Interaktionen zwischen metabolischen, funktionalen, genetischen Faktoren und Umweltfaktoren vermutet [107]. Mit zunehmendem Alter sammelt sich in den RPE-Zellen intrazellulär Lipofuszin an, das sonst eliminiert werden würde [114]. Durch Verdickung der Kollagenschicht der Bruchmembran und daraus resultierender Degeneration und Kalzifikation derselben sowie durch Verdünnung der Choriokapillaris und dadurch erschwertem Abtransport von extrazellulärem Material bilden sich Drusen [115]. Die bisherige Forschung liefert auch Hinweise auf eine Beteiligung des Immunsystems und dabei insbesondere des Komplement-Systems, das durch einen Parainflammation genannten Zustand einen großen Einfluss in der alternden Retina hat. Parainflammation ist charakteristisch für nicht-proliferatives Gewebe, das durch einen hohen Metabolismus geprägt ist [116]. Als Hauptverursacher für Parainflammation wurde oxidativer Stress identifiziert [117]. Das RPE ist aufgrund des hochaktiven Stoffwechsels reich an Mitochondrien und damit die Hauptquelle von ROS in der Netzhaut [118]. Durch die Verarbeitung von Licht in einen Seheindruck entsteht zusätzlich oxidativer Stress [118]. Eine RPE-Dysfunktion aufgrund einer Schädigung der mtDNA im RPE durch oxidativen Stress ist als ursächlich für die Pathogenese der AMD beschrieben worden. Die Schädigung der mtDNA wurde im RPE und nicht im Bereich der Netzhaut beobachtet [119].

Schon 2002 konnten mittels Farb-Doppleruntersuchung erhöhte Flusswiderstände der retrobulbären Durchblutung bei Patienten mit fortgeschrittenen Formen von AMD nachgewiesen werden [120]. Bei Patienten mit der Diagnose trockene AMD konnten in der Zentralarterie erhöhte Flusswiderstände im Vergleich zu Patienten mit der Diagnose feuchte AMD nachgewiesen werden [121]. Auch ein unregulierter choroidaler Blutfluss könnte zu unregelmäßiger Sauerstoffversorgung und Lipidkonzentration sowie dadurch zu erhöhten Konzentrationen von oxidativem Stress (ROS) führen [117]. Das Altern als ein Hauptrisikofaktor für die Erkrankung ließe sich durch die im Alter zunehmende endotheliale Dysfunktion und mit dem kumulativen Effekt der oxidativen Schädigung erklären [122]. Es wurde im Alter eine abnehmende Funktion der Mangan-Hydroperoxid-Dismutase and Aldehyd-Dehydrogenase beschrieben [123] und damit wurde für das Altern auch eine reduzierte antioxidative Funktion beschrieben. In vitro konnte an der A. carotis der Maus für die Kupfer-Zink-Dismutase eine Beschützerrolle vor Ang II-induzierter endothelialer Dysfunktion gezeigt werden [28].

2.4.8. Diabetische Retinopathie

Diabetes mellitus ist eine Gruppe von Erkrankungen, deren gemeinsames Merkmal eine chronische Hyperglykämie ist. Ursächlich ist eine Störung der Insulinsekretion, eine Störung der Insulinwirkung oder eine Kombination aus beiden. In 2010 waren weltweit 0,8 Millionen Menschen aufgrund Diabetes mellitus erblindet und 3,7 Millionen hatten aufgrund von Diabetes visuelle Einschränkungen. Im Vergleich zu 1990 war dies eine deutliche Zunahme der Fälle. Diabetes ist die Haupterblindungsursache im erwerbsfähigen Alter und hat daher einen signifikanten sozioökonomischen Einfluss [124, 125]. Aufgrund der langen asymptomatischen Phase, v. a. bei Diabetes Typ 2, wird die Krankheit oft erst spät entdeckt und daher sind Schäden häufig schon bei Diagnosestellung vorhanden [126].

In der an der Universitätsklinik Mainz durchgeführten Gutenberg-Gesundheits-Studie hatten 9,2 % der Teilnehmer Diabetes mellitus Typ 2. Dabei wurde davon bei 25,2 % aufgrund der Screeningstudie die Erstdiagnose gestellt. Von den Erstdiagnostizierten konnte bei 13 % eine diabetische Retinopathie diagnostiziert werden [126].

Im Verlauf der Erkrankung bilden sich aufgrund der retinalen Gefäßveränderungen lokale Ischämien und damit Veränderungen an der Netzhaut. Hierbei handelt es sich vor allem um Neovaskularisationen. Fundoskopisch können diese gut beurteilt werden. Veränderte retrobulbäre Durchblutungsverhältnisse konnten allerdings sowohl bei Typ 1 als auch Typ 2 nachgewiesen werden [127]. Neuere Studien konnten sowohl an der Maus als auch beim Menschen eine Beteiligung von Endothelin-1 sowohl bei Diabetes mellitus als auch beim retinalen Blutfluss und Neuropathien am Sehnerv zeigen. Bei Patienten mit Diabetes konnte sowohl ein erhöhter Endothelin-1-Spiegel gezeigt werden als auch eine positive Korrelation zwischen erhöhten Endothelin-1-Spiegeln und diabetischer Mikroangiopathie [128].

Durch die chronische Hyperglykämie bei Diabetes mellitus entsteht in der Gefäßwand oxidativer Stress, der zu Veränderungen der Gefäßwand und zu vaskulärer Dysfunktion durch Aktivierung proinflammatorischer Enzyme führen kann [55, 129]. Folgen sind Makro- und Mikroangiopathien, z. B. die diabetische Nephropathie oder an der Netzhaut die diabetische Retinopathie. Jedoch geraten zunehmend auch die Effekte auf retinale Neuronen auf die retinalen Gefäße in den Blickpunkt der Forschung. Inzwischen geht man von einer retinalen neurovaskulären Erkrankung aus, da ein einzelner Signalweg nicht die Veränderungen der diabetischen Retinopathie durch ROS erklären kann [130]. Es werden multiple Signalwege, u. a. auch der MAPK-Signalweg aktiviert [131]. Der MAPK-Signalweg ist bekannt als ein Mechanismus in einer verstärkenden Rückkopplung auf die ROS-Produktion und Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsmechanismen. Studien am Rattenmodell konnten die

Rolle des MAPK-Signalweges als Ursache von Apoptose und entzündlichen Reaktionen bei Diabetes mellitus bestätigen [132]. Dieser Zustand chronischer Entzündung führt zu neuronaler und vaskulärer Dysfunktion. An der Netzhaut spricht man daher von einer neurovaskulären Erkrankung.

3. Material

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse des Stammes C57 BL/6 J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) verwendet, darunter sowohl Wild-Typ-Mäuse als auch Knockout-Mäuse für NOX2 (gp91phox).

Die Mäuse waren zum Tötungszeitpunkt 2-4 Monate alt. Standardisierte Bedingungen mit einer Temperatur von 22 ± 2 °C, und Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10 % sowie ein Tag/ Nacht-Rhythmus von 12h sicherten die Vergleichbarkeit. Gefüttert wurde mit standardisiertem Futter für Nagetiere und Trinkwasser. Das Futter wurde auf Vorrat zur Verfügung gestellt.

Nach § 4 Abs. 3 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) wurde die Verwendung der Mäuse dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (LUA) gemeldet (Genehmigungsnummer 23 177-07/G 17-1-050 und 23 177-07/G 16-1-055 mit Erweiterung E1-E3) und dem Tierschutzbeauftragten der Universitätsmedizin Mainz angezeigt.

3.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

3.2.1. DHE-Färbung

- Trägermedium für Kryostatschnitte: Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe, Alphen aanden Rijn, Niederlande),
- Waschlösung: Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS), (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Farbstoff: Dihydroethidium, DHE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Adhäsionsobjektträger: Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig Deutschland)
- Mikroskop: Eclipse TS 100 Mikroskop (Nikon, Yarakucho, Tokyo, Japan)
- Kamera: DS-Fi1-U2 digital microscope Kamera (Nikon, Yarakucho, Tokyo, Japan)
- Bildaufnahmesoftware: Imaging Software NIS Elements (Nikon, Version 1.10 64 bit)

- Wellenlänge Fluoreszenzlicht: 518 nm/ 605 nm (Anregung/ Emission)
- Quantifikation der Aufnahmen mittels ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Download der Version ist am 11.März 2019 erfolgt.

3.2.2 NOX-2-Färbung

- Kaninchen-Antikörper gegen NOX2 (Abcam, Waltham, Massachusetts, USA, Katalog Nummer ab129068, Verdünnung 1:200), 2 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur
- Sekundärer Antikörper: Polyklonaler Rhodamine Rot-X-gekoppelter Antikörper der Ziege gegen Kaninchen Antigene 111-295-003 Verdünnung 1:200 (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Fixiermedium: 4 % Paraformaldehyd
- Inkubationsmedium: 1 % Serumalbumin des Rinds
- Waschlösung: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)
- Fluoreszenzkonservierung mittels Eindeckmedium: Vectashield Antifade Montagemedium und Gegenfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland)
- Quantifikation der Aufnahmen mittels ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), Download der Version am 11.März 2019 erfolgt.

3.2.3. PCR

Verwendete Primer:

- Murines ACTB (NM_007393.5)
- NOX1 (NM_172203.2)
- NOX2 (NM_007807.5)
- NOX4 (NM_015760.5)
- XDH – Xanthin Dehydrogenase (NM_011723.3)
- ACTB – β -Aktin-Gen (NM_007393.5)

Die qPCR-Primer wurden von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland synthetisiert.

Homogenisierung FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich)

Extraktion der RNA Absolutely RNA Nanoprep (Stratagene, La Jolla, Kalifornien)

oder teils alternativ: RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

RT-PCR-Kit Superscript (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Quantitative PCR-Analyse GeneAmp StepOne Plus;
(Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 1: Verwendete Primer-Sequenzen

Gen	Vorwärtsrichtung	Rückwärtsrichtung
NOX1	GGTTGGGGCTGAACATTTTTTC	TCGACACACAGGAATCAGGAT
NOX2	GCACCTGCAGCCTGCCTGAATT	TTGTGTGGATGGCGGTGTGCA
NOX4	GGCTGGCCAACGAAGGGGTAA	GAGGCTGCAGTTGAGGTTTCAGGACA
XDH	CGATGACGAGGACAACGGTA	TGAAGGCGGTCATACTTGGAG
ACTB	CACCCGCGAGCACAGCTTCTTT	AATACAGCCCGGGGAGCATC

3.2.5. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Zusammensetzung Krebs-Henseleit Pufferlösung

Name	Summenformel	Konzentration
D(+)-Glucose Monohydrat	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	11 mM
Kaliumchlorid	$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	4,7 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	1,2 mM
Kalziumchlorid-Dihydrat	KCl	2,5 mM
Magnesiumsulfat Hydrat	$MgSO_4 \cdot H_2O$	1,2 mM
Natriumchlorid	NaCl	118,3 mM
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	25 mM

Tabelle 3: Zusammensetzung High K⁺ Krebs-Henseleit Lösung

Name	Summenformel	Konzentration
D(+)-Glucose Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ * H ₂ O	11 mM
Kaliumchlorid	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	100 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
Kalziumchlorid-Dihydrat	KCl	2,5 mM
Magnesiumsulfat Hydrat	MgSO ₄ * H ₂ O	1,2 mM
Natriumchlorid	NaCl	17 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	25 mM

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien bei funktionellen Experimenten

Substanz	Hersteller	CAS-Nr
17-ODYA	Tocris Bioscience, Bristol, UK	34450-18-5
Acetylcholin	Sigma-Aldrich, München, DE*	60-31-1
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich, München, DE*	4474-91-3
Baicalein	Sigma-Aldrich, München, DE*	491-67-8
Candesartan	Tocris Bioscience, Bristol, UK	139481-59-7
Indomethacin	Sigma-Aldrich, München, DE*	53-86-1
N(ω)-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME)	Sigma-Aldrich, München, DE*	51298-62-5
PD 123319 Ditrifluoroacetat	Tocris Bioscience, Bristol, UK	136676-91-0
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München, DE*	61-76-7
Natriumnitroprussiat Dihydrat (SN-)	Fluka - Sigma-Aldrich, München, DE*	13755-38-9
Tiron	Fluka - Sigma-Aldrich, München, DE*	270573-71-2
U 46619	Tocris Bioscience, Bristol, UK	56985-40-1

(*DE = Deutschland)

Tabelle 5: Apparative Ausstattung funktionelle Experimente.

Allgemeine Apparative Ausstattung für Präparation und funktionelle Experimente-	
-	Stereo-Zoommikroskop Olympus SZ61; Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan
-	Invertiertes Lichtmikroskop SXB-1A, Lowest Price Microscopes, Missouri, USA
-	Mikro Pinzetten Größe 4/5 und 5/5; Dumont, Montignez, Schweiz
-	Mikro Scheren; Geuder, Heidelberg, Deutschland
-	Peristaltikpumpe Cyclo II; Carl Roth, Karlsruhe,
-	Perfusionskammer, Spezialanfertigung; Jim's Instruments MFG. INC. Iowa City USA
-	Vertical Pipette Puller, Model 700C; David Kopf Instruments, Tujunga, Kalifornien, USA
-	Mikro-Glaskapillaren, Drummond Scientific Company, Broomall, PA 19008, USA
-	Wärmequelle; Haake FE2, Haake, Karlsruhe, Deutschland
-	Laptop Toshiba Satellite; Toshiba, Minato, Tokyo, Japan
-	Aufzeichnungsprogramm, Cyberlink PowerDirector Version 10
-	Ophthalmochirurgisches monofiles Nahtmaterial Größe 10-0 und 11-0 (Alcon und Ethilon)

4. Methoden

4.1. Kryoschnitte und Dihydroethidium (DHE)-Färbung

Durch Ang II-induzierter oxidativer Stress wurde mit Hilfe der DHE-Färbung nachgewiesen. Nach Inkubation über Nacht wurden die Gefäße in Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound positioniert, mit Hilfe flüssigen Stickstoffs schockgefroren und danach bei -80 °C bis zur Durchführung der Färbung gelagert. Am Tag der Färbung wurden Kryoschnitte von 10 µm Dicke mit Hilfe des Kryostats bei -30 °C hergestellt und anschließend die Färbung mit Dihydroethidium (DHE) durchgeführt. Nach Übertragung auf den Objektträger wurden die Schnitte mit 1 µM DHE für 30 Minuten (min) bei 37 °C in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Anschließend wurden Fotoaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Der Transport zwischen den verschiedenen Arbeitsplätzen wurde aufgrund der Lichtsensibilität mit Hilfe einer im Labor hierfür üblichen lichtdichten Transportkammer

durchgeführt. Fotografiert wurde immer mit den gleichen Einstellungen (Expositionszeit: 2,4 s, Gain: 100ms, TRITC Filter) mit einer Mikroskopkamera (DS-Fi1-U2, Nikon, Yurakucho, Tokyo, Japan). Die Bilder der Schnitte wurden später mit Hilfe der Software ImageJ quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe der Dihydroethidium (DHE)-Färbung (Molekularformel: C₂₁H₂₁N₃) kann die Menge der intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) quantifiziert werden. DHE reagiert mit zytosolischem Hyperoxid (O₂⁻), kann aber auch durch ONOO⁻ und OH⁻ zu 2-Hydroxyethidium und Ethidium umgewandelt werden [133]. Da diese Produkte fluoreszierend sind, können diese anhand der Fluoreszenz nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Färbung erfolgt immer in einem speziell abgedunkelten Raum da es nach Lichtexposition zu Selbstoxidation kommt.

4.2. Immunfluoreszenz-Färbung

Um eine möglicherweise stattfindende Hochregulation der NOX2 zu quantifizieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden in oben beschriebener Weise Kryoschnitte der inkubierten Gefäße hergestellt. Am Tag der Färbung wurden Kryoschnitte von 10 µm Dicke mit Hilfe des Kryostats bei -30 °C hergestellt. Als Negativkontrolle wurde Gewebe von NOX-defizienten (NOX2^{-/-})-Mäusen gefärbt. Auf die Schnitte wurde der monoklonale Antikörper gegen NOX2 (ab129068, Abcam, Waltham, Massachusetts, USA) in der Verdünnung 1:200 appliziert. Zuerst erfolgte eine Fixierung für 20 min in 4 % Paraformaldehyd, eine Inkubation mit Rinderserumalbumin (1 %) für 30 min gefolgt von der Antikörper-Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen in PBS-Lösung für jeweils 5 min. Ein sekundärer Rhodamin Red-X-gekoppelter Antikörper wurde für 1 Stunde appliziert. Es erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS-Lösung für jeweils 5 min. Danach wurde VECTASHIELD© mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) auf die Schnitte aufgetragen, um die Zellkerne darzustellen und der Schnitt eingedeckt. Wie im Rahmen der DHE-Färbung beschrieben, wurde die Fluoreszenz fotografiert und mit Hilfe des Programms ImageJ quantifiziert.

4.3. Funktionelle Experimente

4.3.1. Ablauf

Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Zuerst wurde der Kopf mit Hilfe einer groben Schere entfernt und im Anschluss mit feineren Werkzeugen in der Sagittalebene in zwei Hälften getrennt. Eine Hälfte wurde im Kühlschrank in kalter Krebs-Henseleit Lösung für die spätere Präparation aufbewahrt. Die weitere Präparation erfolgte in 4 °C kalter Krebs-

Henseleit Lösung, welche alle 15min durch frische kalte Lösung ausgetauscht wurde. Die Präparation der A. ophthalmica erfolgte von lateral nach medial, um nicht bei schlechter Übersicht die Gefäße vorzeitig abzutrennen oder zu zerstören.

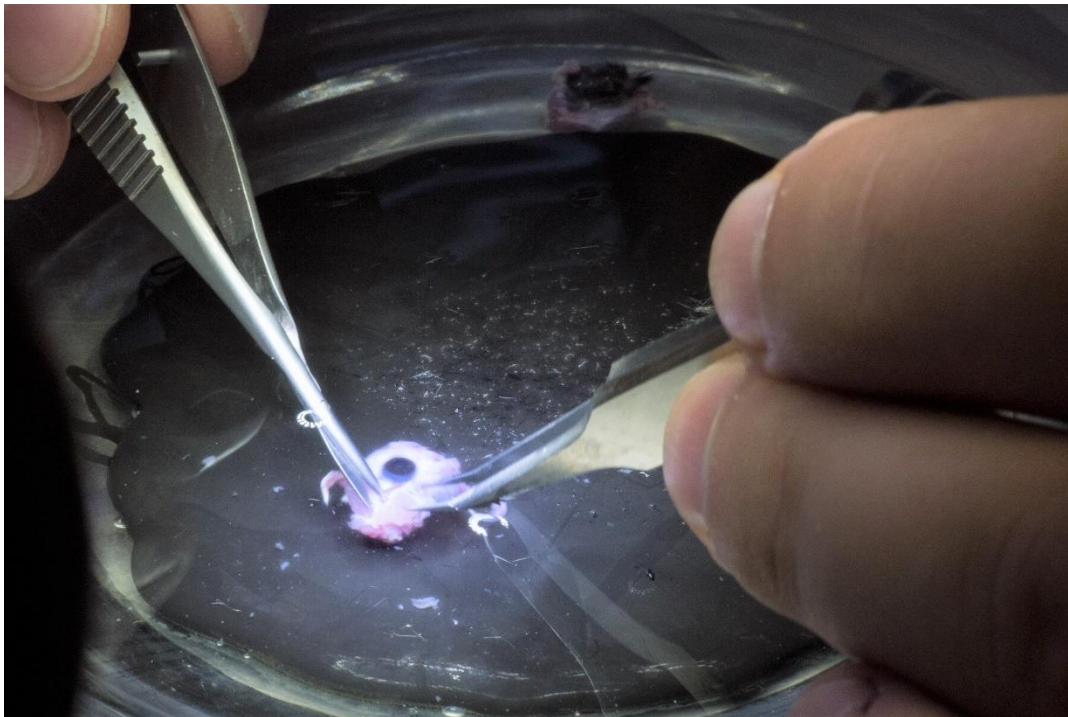


Abbildung 2: Präparation der A. ophthalmica. Hier Entfernung umgebendes Muskel- und Knochengewebe

In einem ersten Schritt wurde das Fell, das Unterhautfett und das Bindegewebe abgetrennt. Es folgte die äußere Muskulatur, die Kaumusculatur, der Unterkiefer und die Abtrennung der großen Schneidezähne des Oberkiefers. Die Präparation wurde von außen Richtung Augapfel mit zunehmend feineren Scheeren unter Stereomikroskopie vorgenommen. Nach Durchtrennung des Os zygomaticus und Eröffnung des Os parietale bestand genug Übersicht, um eine vorsichtige und schrittweise Präparation von beiden Seiten in die knöcherne Orbitalhöhle zu gewährleisten. Des Weiteren wurden die Lider und die Hardersche Drüse vorsichtig entfernt um somit gute Sichtverhältnisse auf Muskelkonus und Gefäße zu ermöglichen. Nach Entfernung der Augenmuskeln und der Bindehaut (Konjunktiva) ließen sich die A. ophthalmica entlang des N. Opticus darstellen. Durch Freipräparation und Abtrennung des umgebenden Bindegewebes ließen sich die A. ophthalmica freilegen. Anders als beim Menschen zeigte sich im Mausmodell der Eintritt der A. ophthalmica in den Sehnervenkopf erst in der Bulbuswand. Die A. ophthalmica wurde kurz vor Eintritt in den Bulbus abgetrennt. Es erfolgte noch eine vorsichtige Säuberung der A. ophthalmica vom umgebenden Bindegewebe, um eine bessere Darstellung der Gefäßwandgrenzen in der Videomikroskopie zu erreichen sowie eine Unterteilung in mehrere ca. 3 mm lange Gefäßsegmente. Nach diesem Verfahren wurde auch die zweite Kopfhälfte präpariert.

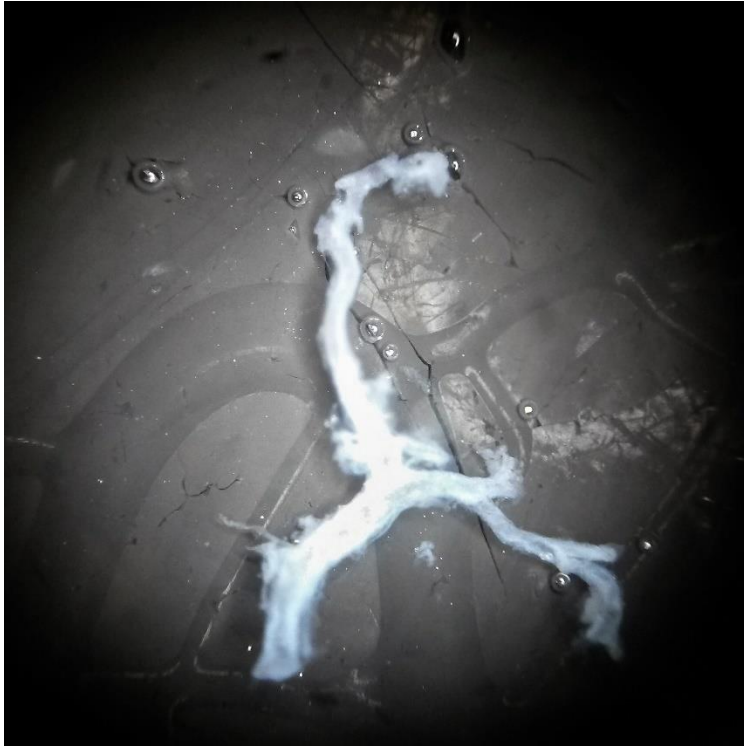


Abbildung 3: Präparierte *A. ophthalmica* mit abgehenden Ästen.

Die Segmente wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Merck, Darmstadt, Germany) perfundiert, das 5,5 mmol/l Glukose, 120 U/ml Penicillin, 120 µg/mL Streptomycin und entweder Ang II (10^{-9} M, 10^{-8} M oder 10^{-7} M) oder das Kontrollmedium (NaCl 0,9 %) in gleichem Volumen enthielt. Danach wurden die Gefäßsegmente in eine Zellkulturschale transferiert, die 2 ml der gleichen Lösung enthielten, mit der das jeweilige Gefäß bereits perfundiert wurde. In dieser Lösung wurden die Gefäßsegmente über 22 Stunden bei 37 °C (5 % CO₂) in einem Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurden die Gefäße einzeln dem Inkubator entnommen und in Perfusionskammern transferiert. Diese enthielten Krebs-Henseleit Lösung und zwei Glaskanülen. An letzteren wurden die Gefäßsegmente kanüliert und mittels eines 10-0 Nylonfadens fixiert. Falls vorliegend wurden Seitenäste mittels 11-0 Nylonfäden verschlossen. Die so vorbereitete Perfusionskammer enthielt eine Kapazität von 10 ml. Diese wurde über seitliche Anschlüsse an ein Kreislaufsystem mit oxygenierter Krebs-Henseleit Lösung mit Heizung (Zieltemperatur im Kreislauf: 37 °C, pH 7,4), Pumpe und Sauerstoffversorgung angeschlossen (Vgl. Abb. 4). Ein Druck von 50 mmHg wurde über Endanschlüsse der Glaspipetten in das Gefäßlumen mittels hydrostatischen Druckes appliziert. Die Dichtigkeit des Gefäßes wurde durch Kontrolle der Stabilität des Hydrostatischen Druck überprüft. Die Prüfung der Gefäßfunktion wurde mit Hilfe von hochmolekularer KCl-Lösung durchgeführt. Es musste eine Reduktion auf mindestens 50 % des Ausgangsdurchmessers gezeigt werden.

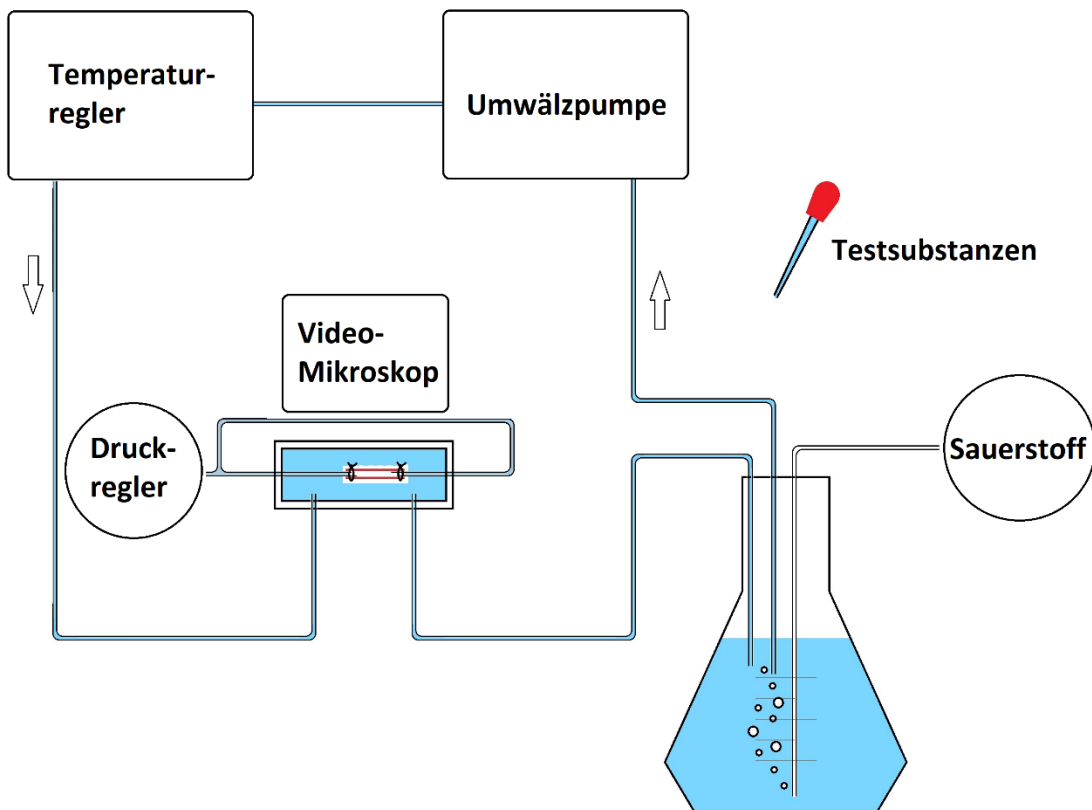


Abbildung 4: Schematische Darstellung Versuchsaufbau der funktionellen Experimente.

Nach ausreichender Zeit (ca. 30 min) zur Akklimatisierung und Tonisierung des Gefäßes wurde mit dem jeweiligen Experiment begonnen. Zu testende vasoaktive Substanzen wurden nach Start des Experiments alle 2 min in aufsteigender Konzentration in den Kreislauf titriert. Dies geschah in einem 200 ml fassenden und frische Krebs-Henseleit Lösung enthaltenden Erlenmeyerkolben. Somit wurde gesichert am Gefäß möglichst konstante Konzentrationen der zu testenden Substanzen zu erhalten und Konzentrationsspitzen zu vermeiden.

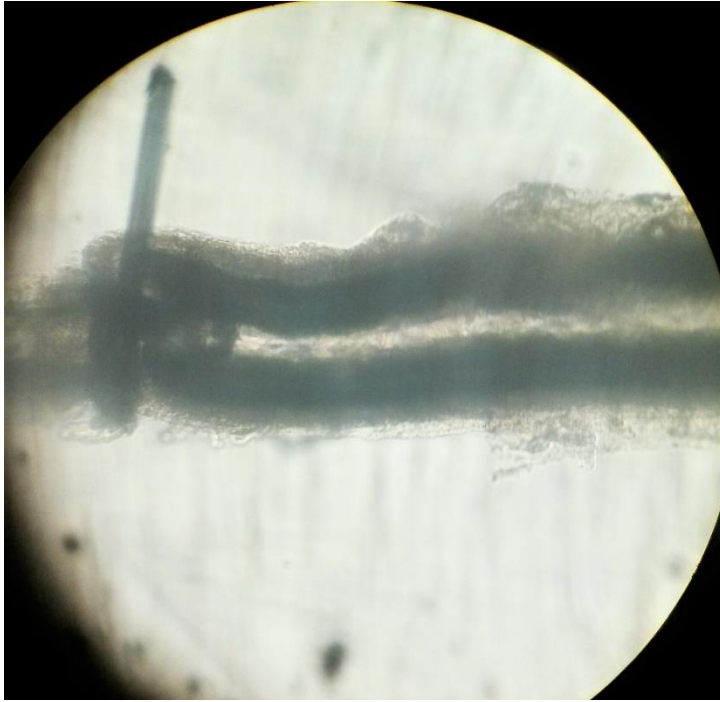


Abbildung 5: Ende eines Gefäßes, fixiert mittels 10-0 Faden und kanüliert auf eine Glaskanüle

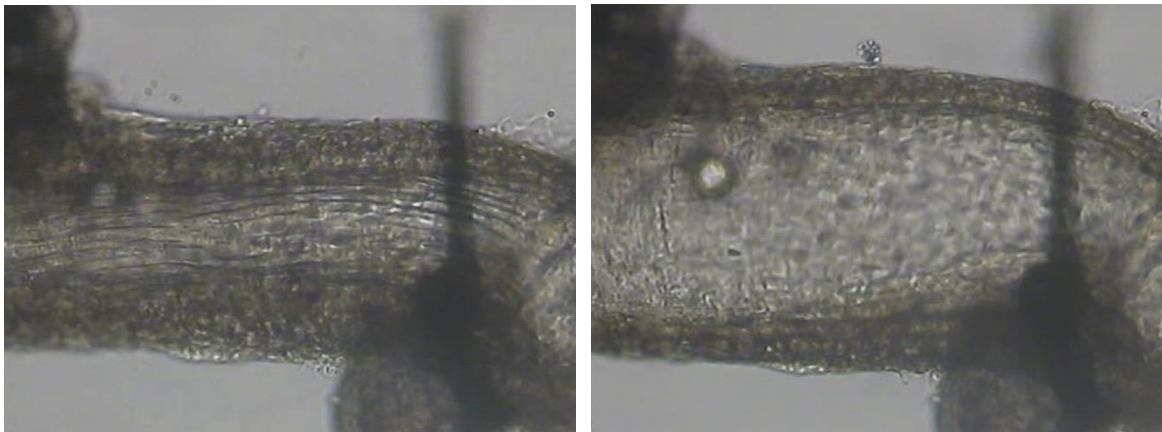


Abbildung 6: Kanüliertes Gefäß während funktionellem Experiment. Links in kontrahiertem, rechts in dilatiertem Zustand abgebildet

Eine Veränderung des Gefäßdurchmessers wurde mit, über der Versuchskammer angeordneter, Videomikroskopie dokumentiert. Die im Video aufgenommenen Gefäßdurchmesser wurden mit Hilfe eines Bildschirmlineals während des Experiments vermessen und notiert. Jedoch wurde jede Videoaufnahme im Nachgang am Bildschirm erneut genau ausgemessen. Nach Abschluss einer Konzentrations-Reaktions-Kurve wurde der Wirkstoff mit frischer Krebs-Henseleit Lösung aus dem Kreislauf ausgewaschen. Teilweise wurden danach weitere Konzentrations-Vasodilatations-Kurven mit dem gleichen Gefäß ergänzt. Diese wurden allerdings nur mit Mischungen von Substanzen durchgeführt, die die vorher bereits verwendete zu testende Substanz auch beinhalteten.

4.3.2. Ziel der einzelnen Experimente:

4.3.2.1. Integritätsprüfung

Vor jedem Experiment wurde eine Funktionstestung des Gefäßes durchgeführt. Hierfür wurde in den Kreislauf High-K⁺-Krebs-Henseleit Lösung gegeben, um durch die erhöhte Kalium-Konzentration eine Vasokonstriktion auszulösen. Hierbei musste sich das Gefäß in der Videomikroskopie, um mindestens 50 % seines Ausgangsdurchmessers kontrahieren. Bei positivem Test konnte nach Auswaschen der High-K⁺-Krebs-Henseleit Lösung und Vasodilatation auf den Ausgangsdurchmesser mit den Experimenten begonnen werden.

4.3.2.2. Testung, ob die endothelabhängige vasodilatative Antwort nach Einwirkung von Ang II verändert ist.

Nach Präparation wurden die Gefäße in Kontrollösung oder Ang II (in der Konzentration 10⁻⁹, 10⁻⁸ oder 10⁻⁷ mol/l) über Nacht inkubiert. Folgender Experimentablauf wurde mit jeweils einem Gefäß aus einer der vier Inkubationsgruppen durchgeführt.

- a) Erstellung der Referenzkurve: Nach der Integritätsprüfung wurde eine konzentrationsabhängige Kontraktionskurve des Gefäßes mit U46619 (Thromboxan-Analogon) in ansteigender Konzentration ($c=10^{-11}$ bis 10^{-6} mol/l) erstellt.
- b) Im Anschluss wurde mit U46619 eine Vorkontraktion auf 70-50 % des Ausgangsdurchmessers durchgeführt.
- c) Testung der ACh-vermittelten Vasodilatation: Erstellung einer Referenz-Konzentrations-Wirkungs-Kurve für ACh ($c=10^{-9}$ bis 10^{-4} mol/l in aufsteigender Konzentration). Auswaschen des Wirkstoffs und erneute Vorkontraktion mit U46619.
- d) Testung der endothelunabhängigen NO-vermittelten Vasodilatation: Erstellung einer Referenz-Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Nitroprussid einem exogenen Stickstoff-Donor ($c=10^{-9}$ bis 10^{-4} mol/l in aufsteigender Konzentration).

4.3.2.3. Testung, ob Ang II Einfluss auf die vasodilatativen Post-Rezeptor-Mechanismen hat.

Alle folgenden Gefäße wurden in Ang II der Konzentration 10⁻⁷ mol/l inkubiert. Die Vorkontraktion erfolgte mit U46619. Danach wurde eine Referenzkurve mit ACh in aufsteigender Konzentration ($c=10^{-9}$ bis 10^{-4} mol/l) erstellt. Nach dem Auswaschen erfolgte

eine Inkubation über mindestens 30 Minuten mit der spezifischen Testsubstanz. Nach erneuter Präkonstriktion mit U46619 erfolgte die Erstellung einer Referenz-Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit ACh.

4.3.2.4 Untersuchung des NOS-abhängigen Signalweges:

- a) Die Beteiligung der NO-Synthasen an der cholinergen Vasodilatation wurde mit Hilfe von Inkubation mit dem nicht-Isoformselektiven NOS-Inhibitor L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) getestet.
- b) Die Beteiligung der Prostaglandinsynthese an der cholinergen Vasodilatation wurde mit Hilfe von Inkubation mit dem nicht-Isoformselektiven COX-Inhibitor Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) geprüft.
- c) Die Beteiligung des EDHF-Weges an der Vasodilatation wurde mit Hilfe der Blocker L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) und Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) geprüft. In dieser Blocker-Kombination bleibt nur EDHF als möglicher endothelabhängiger vasodilatativer Faktor übrig.
- d) Kaliumchlorid in der verwendeten Konzentration unterdrückt die Hyperpolarisation der Zellmembran und unterdrückt dadurch die Wirkung von EDHF. Daher wurde in der verwendeten Kombination von Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) +L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + KCl ($c=30$ mmol/l) eine Negativkontrolle durchgeführt und alternative, ggf. noch unbekannte Kompensationsmechanismen unter Inkubation mit Ang II untersucht.
- e) Um eine Veränderung des LOX-abhängigen Weges des EDHF-Zweiges der Vasodilatation zu untersuchen, wurde eine Testung bei Kombination von L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) +17-ODYA ($c=10^{-5}$ mol/l) durchgeführt.
- f) Um eine Veränderung des CYP450-abhängigen Weges des EDHF-Zweiges der Vasodilatation zu untersuchen, wurde eine Kombination von L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) +Baicalein ($c=10^{-5}$ mol/l) zur Testung gewählt.

4.3.2.5. Kann durch Reduktion des oxidativen Stresses eine Verbesserung der Vasodilatation erreicht werden?

Um zu prüfen, ob durch plötzliche Reduktion von oxidativem Stress eine Verbesserung der Vasodilatation erreicht werden kann, wurde eine 30-minütige Inkubation mit Tiron ($c=10^{-3}$ mol/l) durchgeführt. Dies wurde sowohl mit in Kontrolllösung, als auch in Ang II ($c=10^{-7}$ mol/l)

inkubierten Gefäßen durchgeführt. Im Verlauf wurden dann nach Präkonstriktion mit U46619 Konzentrations-Wirkungskurven mit ACh ($c=10^{-9}$ bis 10^{-4} mol/l in aufsteigender Konzentration) erstellt. Tiron fungiert als Hyperoxid-Fänger und konnte in Experimenten eine Ang II-induzierte endotheliale Dysfunktion verhindern [28].

4.3.2.6. Gibt es eine Beteiligung von AT₁R an den Ang II-abhängigen Effekten an der A. ophthalmica?

Um die Beteiligung des AT₁R an den Ang II-abhängigen Effekten auf die A. ophthalmica zu untersuchen, erfolgte eine Inkubation über Nacht mit Ang II, dem Ang II-Rezeptor Typ 1-Blocker Candesartan ($c=10^{-5}$ mol/l) und Ang II sowie die Kontrollgruppe mit Inkubation im Kontrollmedium und dem Kontrollmedium mit Candesartan.

4.3.2.7. Gibt es eine Beteiligung von AT₂R an den Ang II-abhängigen Effekten an der A. ophthalmica?

Um die Beteiligung des AT₂R an den Ang II-abhängigen Effekten auf die A. ophthalmica zu untersuchen, erfolgte eine Inkubation über Nacht mit Ang II und Ang II mit dem Ang II-2-Rezeptor-Blocker PD123319 Ditrifluoracetat ($c=10^{-6}$ mol/l) sowie die Kontrolle mit Kontrollmedium und Kontrollmedium mit PD123319 Ditrifluoracetat.

4.3.3. Datengewinnung funktionelle Experimente

Die oben beschriebenen Perfusionskammern wurden nach Kanülierung der Gefäße an ein Kreislaufsystem mit Heizung angeschlossen. Die Versuchskammern wurden unter ein Mikroskop mit angeschlossener Kamera montiert. Über einen verbundenen Computer wurde das Videosignal mit Hilfe von Cyberlink PowerDirector aufgezeichnet. Eine ausreichende Konstriktion wurde durch Messung mit einem Bildschirmlineal gesichert. Die erfassten Videos wurden im Verlauf erneut mit einem Bildschirmlineal ausgemessen und die Werte tabellarisch aufbereitet.

4.4. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist aus der modernen Forschung und Medizin nicht wegzudenken. Mit dieser Methode wurde es erstmals möglich, die in geringen Mengen vorkommende, und sonst nicht zu analysierende, DNA zu multiplizieren und zu untersuchen.

Zu untersuchende DNA/ RNA-Fragmente werden mittels reverser Transkriptase (RT) mehrfach repliziert, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung stattfindet (RT-PCR). Welche DNA/ RNA-Fragmente amplifiziert werden, kann mit spezifischen Primern bestimmt werden. Primer fungieren als für die DNA-Polymerasen notwendige Startpunkte und bestimmen auch den zu amplifizierenden Abschnitt, da Primer spezifisch für Nucleinsäureabschnitte sind.

4.4.1. Probengewinnung

wurden die Gefäße im Kontrollmedium oder Ang II für 22h inkubiert. Beide Medien Die zu analysierenden Gefäße wurden, wie bereits im Kapitel Material – Probegewinnung beschrieben, freipräpariert. Während der Präparation wurden das Material in kalter Krebs-Henseleit Lösung (handelsüblicher Kühlschrank bei +4 °C) aufbewahrt oder im Rahmen der Präparation in regelmäßigen Abständen (ca. 15 min) durch frische und kalte Lösung ausgetauscht. Nach Beendigung der Präparation enthielten folgende Zusammensetzung: 5 mmol/l Glucose, 120 U/ml Penicillin, 120 µg/ml Streptomycin. Zusätzlich wurde entweder Ang II (10^{-7} M) oder doppelt destilliertes Wasser (Kontrollmedium) hinzugefügt. Danach wurde das Gewebematerial mit Hilfe von Stickstoff schockgefroren und im Verlauf bis zur Diagnostik in einem -80 °C Kühlschrank für 2-3 Monate gelagert.

4.4.2. Funktioneller Ablauf

Das Gefäßgewebe wurde in Lysispuffer homogenisiert. Unter Verwendung eines Lightcyclers® wurde die RT-PCR mit einem StepOnePlus-Gerät durchgeführt. Die verwendeten Einstellungen waren wie folgt:

Anfängliche Denaturierung: 10 min bei 95 °C; Zyklus (40 Wiederholungen): Denaturierung 20 s bei 95 °C, Primer-Bindung und Synthese jeweils 40 s bei 60 °C, Schmelzpunkt-Phase von 60 °C ausgehend alle 5 s um 0,5 °C ansteigend bis 95 °C.

Um DNA-Produkte während der qPCR zu quantifizieren, wurde der Fluoreszenz SYBR-Green-Farbstoff verwendet. Zur Quantifizierung des Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) der mRNA-Produkte wurde als Referenz das beta-Aktin-Gen (ACTB) verwendet. Alle Vorgänge erfolgten

nach dem Hersteller-Protokoll. Im folgenden Schritt wurde mit Hilfe eines RT-PCR-Kits RNA in komplementäre DNA (cDNA, engl.: complementary DNA, da durch Reverse Transkriptase entstanden) umgewandelt. Im Anschluss wurde eine quantitative PCR-Analyse durchgeführt.

Ablauf:

Schritt 1: Reverse Transkriptase

Üblicherweise wird für eine PCR doppelsträngiges Genom, also DNA, benötigt. Wenn jedoch einsträngiges Genom, also RNA, multipliziert werden soll muss dies erst in doppelsträngiges Genom umgewandelt werden. Diese Aufgabe übernimmt die Reverse Transkriptase im ersten Schritt. Hierbei entsteht aus der zu untersuchenden mRNA dann cDNA.

Begriffsdefinition:

DNA-Template: DNA-Vorlage, bzw. der zu vervielfältigende Genabschnitt

DNA-Polymerase: Enzym das Desoxyribonukleotide an ein 3'-DNA anfügen kann

Primer: Startermolekül, passend an gesuchten DNA-Strang, an dem die Verlängerung stattfinden kann

Reverse Transkriptase: Enzym das einsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreiben kann

Schritt 2: Amplifikation

Im nächsten Schritt wird das genomische Material vervielfältigt, um signifikante Mengen für die Diagnostik zu produzieren. Welcher Abschnitt untersucht werden soll, bestimmt der für den Abschnitt passend entwickelte Primer, den die DNA-Polymerase benötigt.

Im Einzelnen:

- a) Denaturierung (<96 °C): Spaltung der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten
- b) Primer-Bindung (55-65 °C, je nach Primer): Primer binden an das jeweilige 3'-Ende des Einzelstrangs
- c) DNA-Synthese (72 °C): Primer synthetisiert in 5'-3'- Richtung den komplementären Strang
- d) ggf. erneuter Beginn bei a) und Repetition bis ausreichend DNA-Menge hergestellt wurde (in der Regel 20-40 Zyklen)

Schritt 3: Detektion und Quantifizierung der Produkte

Bei der RT-PCR werden die entstandenen DNA-Produkte nach jedem Zyklus quantifiziert da bei hohen Mengen an Material eine Quantifizierung erschwert ist. Die Detektion der

amplifizierten Matrizen wird i.d.R. mit Hilfe fluoreszierender Moleküle ermöglicht, die an die Matrizen angehängt werden. Durch optische Detektionseinheiten kann die Fluoreszenzintensität ausgewertet werden.

4.5. Statistik

Änderungen der Gefäßdurchmesser werden in Prozent (%) im Vergleich zu dem vorkontrahierten (Gefäßantwort auf Nitroprussid oder ACh) oder im Vergleich zu dem entspannten Zustand (Gefäßantwort auf U46619) als Ausgangsdurchmesser angegeben. Die Daten wurden in GraphPad Prism aufbereitet. Der Vergleich der konzentrationsabhängigen Antwort erfolgte mit Hilfe einer Zweiweg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen. Für Mehrfachvergleiche zwischen Gruppen wurde der Tukey-Test verwendet. Zum Vergleich der Signifikanz der Färbungen und der mRNA-Expression wurde ein ungepaarter T-Test verwendet. Das Signifikanzniveau betrug jeweils 0,05 ($\alpha = 5\%$).

5. Ergebnisse

5.1. Quantifizierung der ROS-Produktion mit Hilfe der DHE-Färbung

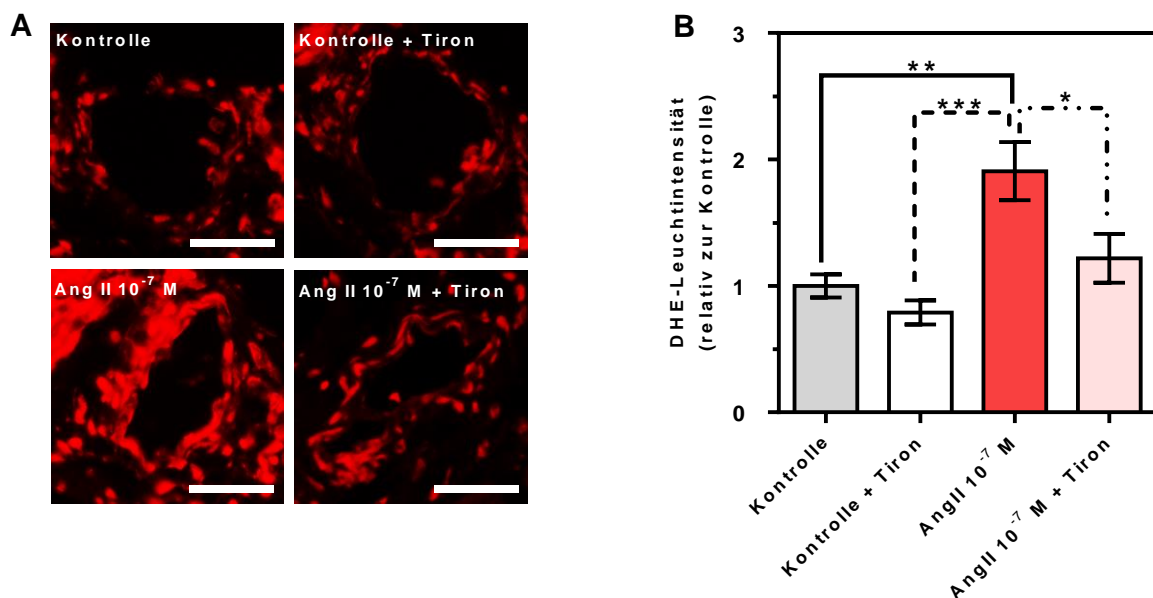


Abbildung 7: A) Abbildung Gefäßschnitte nach DHE-Färbung; B) grafische Darstellung der Leuchtintensität

In den Schnitten der A. ophthalmica (vgl. Methodenteil) zeigt sich nach Inkubation mit Ang II 10^{-7} M in der Gefäßwand ein signifikanter Anstieg der Färbeintensität (vgl. Abb. 7A) und damit

ein Hinweis auf erhöhte Mengen an ROS im Gewebe. Dies konnte quantitativ mit einem Anstieg auf etwa das Doppelte gezeigt werden (Abb. 7B). In der Darstellung ist die Leuchtintensitäten auf die der Kontrollgruppe normiert. In der Messung zeigte sich in der mit Ang II ($c=10^{-7}$ mol/l) inkubierten Gefäßwand (22500 AU) im Vergleich zu der mit Kontrollmedium inkubierten Gefäßwand (15000 AU) eine deutliche Erhöhung. Dies zeigt eine signifikant (jeweils $n=8$ verwendete Proben pro Gruppe, Signifikanzniveau * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) höhere Konzentration an ROS in der Gefäßwand nach Inkubation mit Ang II.

5.2. Funktionelle Experimente

5.2.1. Konzentrationsabhängiger Effekt von Ang II auf die endotheliale Funktion der *A. ophthalmica*

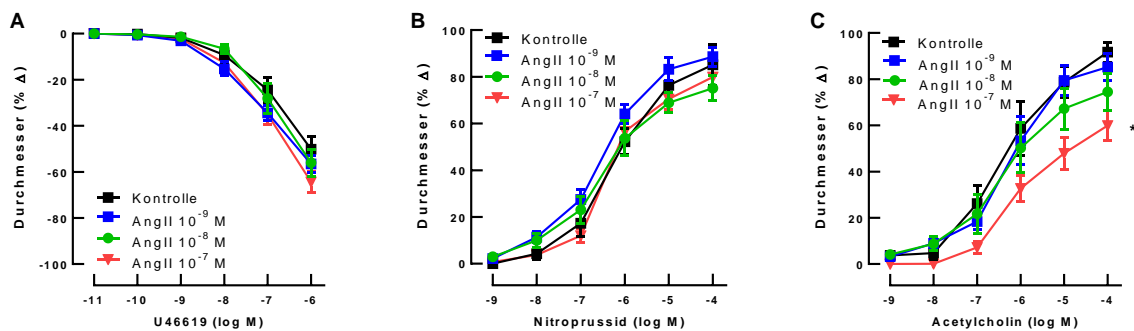


Abbildung 8: Versuchsreihe mit Testsubstanzen in aufsteigenden Konzentrationen von Ang II. Die Versuchsreihen wurden jeweils mit einer Kontrollmedium und 3 verschiedenen Medien mit Ang II, jeweils in aufsteigenden Konzentrationen, durchgeführt

a) Untersuchung der endothelabhängigen Vasokonstriktion (TXA_2 -Mimetikum U46619)

Die Inkubation der *A. ophthalmica* im Kontrollmedium, verglichen mit der Inkubation in Ang II, zeigte keinen signifikanten Unterschied (Anzahl der Versuchstiere $n=8$, Signifikanzniveau $p<0,05$). Somit konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Ang II demnach keinen Einfluss auf die endothelabhängige Vasokonstriktion in der *A. ophthalmica* hat (vgl. Abb. 8A).

b) Untersuchung der endothelunabhängigen Vasodilatation (NO-Spender Nitroprussid)

Nach Inkubation der *A. ophthalmica* mit Ang II zeigte sich auch in der Untersuchung der endothelunabhängigen Vasodilatation in allen Vergleichsgruppen eine beinahe unveränderte Vasodilatation. Es bestand dabei kein signifikanter Unterschied ($n=8$, Signifikanzniveau

p<0,05) zwischen den in Kontrollmedium oder in Ang II inkubierten Gefäßen (Vgl. Abb. 8B). Ang II hat demzufolge auf die endothelunabhängige Vasodilatation in der A. ophthalmica keinen Einfluss.

c) Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation (Acetylcholin vgl. Skizze C)

In allen Vergleichsgruppen konnte eine cholinerge Vasodilatation erzeugt werden. Ein signifikanter Unterschied (n=8, Signifikanzniveau p<0,05) konnte im Vergleich der Kontrolle (schwarze Kurve) mit Ang II in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l inkubierten Gefäße dargestellt werden (vgl. Abb. 8C rote Kurve). Kein signifikanter Unterschied in der Vasodilatation wurde dagegen im Vergleich bei den mit niedrigeren Konzentrationen von Ang II inkubierten Gefäßen gesehen (vgl. Abb. 8C Kurve dargestellt mit blau und grün).

Vergleichbare Experimente durch Didion et al. zeigen bereits bei einer geringeren Ang II-Dosis eine endotheliale Dysfunktion [28]. Beim genannten Effekt, wenn auch in dieser Arbeit erst in recht hohen Dosen gezeigt, handelt es sich um eine endotheliale Dysfunktion. Die Mechanismen der Vasodilatation selbst sind jedoch nicht geschädigt (vgl. hierzu Dosis-Wirkungskurve mit Nitroprussid Abb. 8B).

5.2.2. Identifikation des, durch den oxidativen Stress, betroffenen Ang II-Rezeptorsubtyps

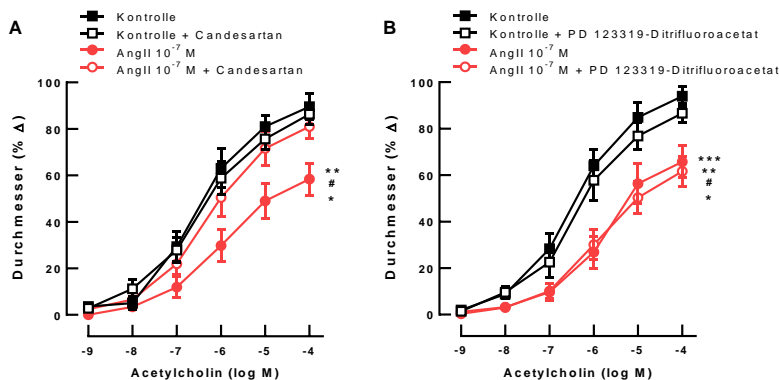


Abbildung 9: Versuchsreihe mit AT₁-Rezeptorblocker (Abb. 8A) und AT₂-Rezeptorblocker (Abb. 8B) jeweils Kontrollmedium gegen Ang II- inkubierte Gefäße

a) Untersuchung der Vasodilatation unter Blockade des AT₁-Rezeptor durch Candesartan

Im Kontrollmedium konnte nach Inkubation mit Candesartan keine signifikante Änderung der vasodilatativen Antwort auf ACh (vgl. Abb. 9A schwarze Kurven) gemessen werden. Die Inkubation mit Ang II zeigte eine signifikant reduzierte Vasodilatation (rote Kurve mit Kreisen,

n=8, Signifikanzniveau ** p<0,001). Eine signifikante und normalisierte Vasodilatation bestand bei mit Ang II und Candesartan inkubierten Gefäßen (vgl. Abb. 9A rote Kurven dargestellt mit Punkten; n=8, Signifikanzniveau * p<0,05). Die Dosis-Wirkungskurve gleicht sich an die im Kontrollmedium inkubierten Gefäße an (vgl. Abb. 9A). Die durch Ang II in der Konzentration 10⁻⁷ mol/l erzeugte endotheliale Dysfunktion kann also durch Hinzufügen von Candesartan aufgehoben werden.

b) Untersuchung der Vasodilatation unter Blockade des AT-2-Rezeptors mit Hilfe von PD123319 Ditrifluoracetat

Bei mit PD123319 Ditrifluoracetat (10⁻⁶ mol/l) inkubierten Gefäßen zeigte sich keine veränderte vasodilatative Antwort auf ACh im Kontrollmedium (vgl. Abb. 9B, schwarze Kurven, n=8, Signifikanzniveau p<0,01). Die durch Ang II signifikant reduzierte cholinerge Vasodilatation (vgl. Abb. 9B rote Kurven, n=8, Signifikanzniveau p<0,001) im Vergleich zu der Vasodilatation in Kontrollmedium (vgl. schwarz dargestellte Kurven) wurde durch PD123319 Ditrifluoracetat nicht signifikant beeinflusst (n=8, Signifikanzniveau p<0,01).

5.2.3. Einfluss von Angiotensin II auf die vasodilatativen Post-Rezeptor-Mechanismen

a) Untersuchung des Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-abhängigen Signalweges:

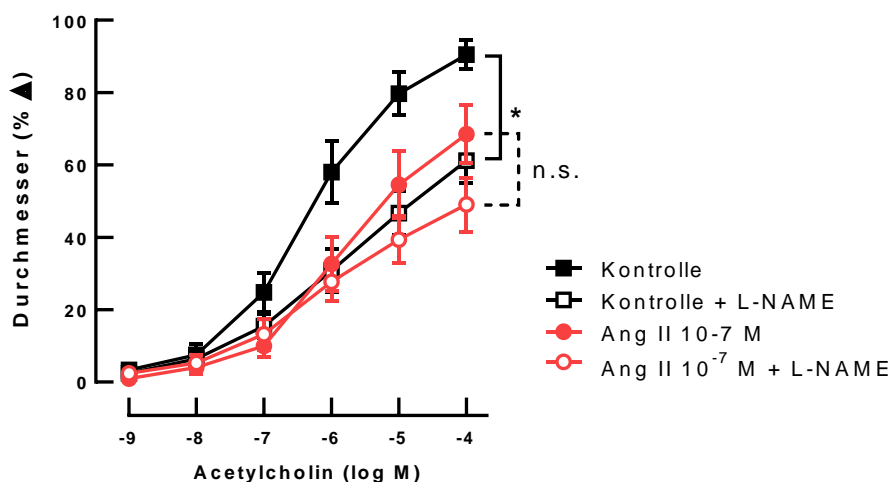


Abbildung 10: Versuchsreihe mit nicht-Isoformselektivem NOS-Inhibitor L-NAME

Bei Verwendung des nicht-Isoformselektiven NOS-Inhibitors L-NAME (c=10⁻⁴ mol/l) konnte eine signifikant verminderte Vasodilatation nach Hinzugeben von L-NAME im Vergleich zum Kontrollmedium gezeigt werden (vgl. Abb. 10 schwarze Kurven, n=8, * p<0,05). Eine

Reduktion der Vasodilatation durch Hinzugeben von L-NAME konnte bei den mit Ang II inkubierten Gefäßen zwar gezeigt werden, diese war jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 10 rote Kurven, n=8). Dies spricht im Vergleich zum Kontrollmedium für eine nicht signifikante Beteiligung des NOS-abhängigen Weges in mit Ang II inkubierten Gefäßen.

b) Die Beteiligung von COX-Metaboliten an der cholinergen Vasodilatation.

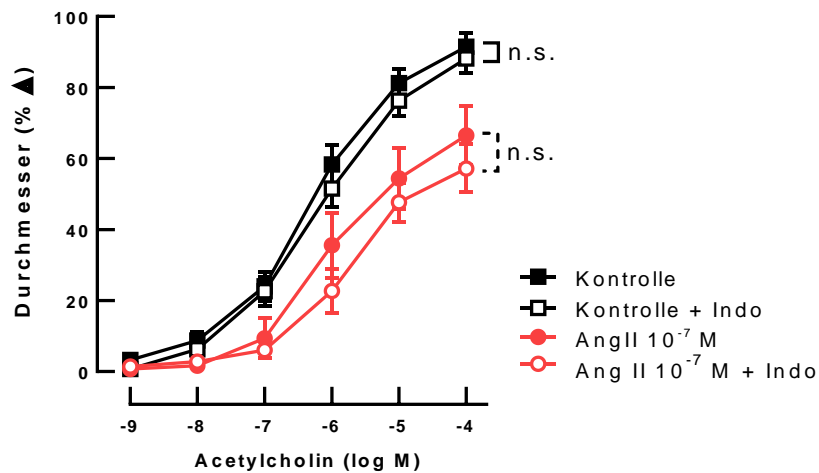


Abbildung 11: Versuchsreihe mit nicht-Isoformselektivem COX-Inhibitor

Im Falle der Verwendung des nicht-Isoform-selektiven Cyclooxygenase (COX)-Inhibitor Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) konnte keine signifikant veränderte Vasodilatation nach Hinzugeben der Testsubstanz gemessen werden (vgl. Abb. 11). Weder in den mit Kontrollmedium (Vgl. Abb. 11, schwarze Kurven), noch in den mit Ang II inkubierten Gefäßen konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (vgl. Abb. 11, rote Kurven).

c) Die Beteiligung des endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-Weges an der vasodilatativen Antwort.

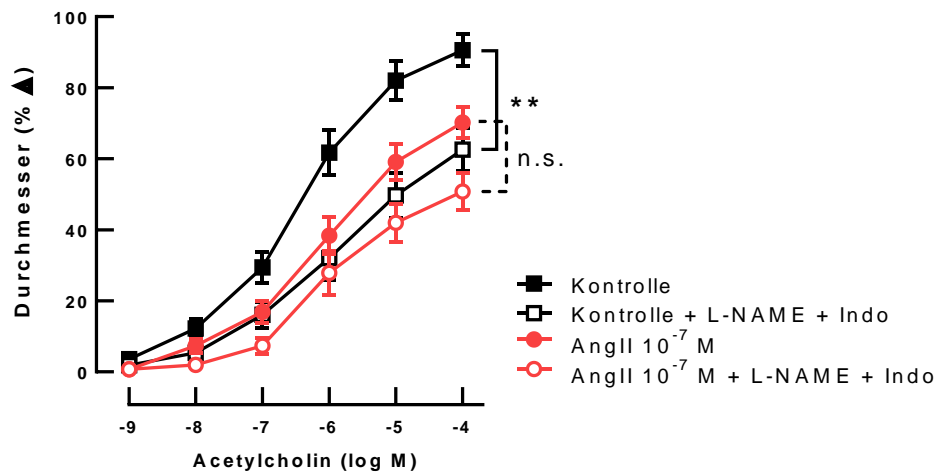


Abbildung 12: Versuchsreihe mit Blockade aller bekannten vasodilatativen Wege an der *A. ophthalmica* mit Ausnahme des EDHF-Weges

Bei kombinierter Verwendung von L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) verbleibt nur noch EDHF als möglicher endothelabhängiger vasodilatativer Faktor. In den Experimenten zeigte eine kombinierte Blockade, in der mit Ang II inkubierten Gruppe keine signifikante Änderung der vasodilatativen Wirkung (vgl. Abb. 12 rote Kurven). Signifikant war die Reduktion der Vasodilatation nur in der mit Kontrollmedium inkubierten Gruppe (vgl. Abb. 12 n=8, Signifikanzniveau ** $p<0,01$). Der relative Anteil an der verbleibenden Vasodilatation ist auf dem Niveau vergleichbar mit der alleinigen Blockade durch L-NAME (vgl. Abb 10 schwarze Kurven). Anders als bereits in retinalen Arteriolen beschrieben [134] besteht hier kein gegenseitig kompensierender Effekt. Eine verstärkte Verminderung der Vasodilatation zeigte sich nicht.

d) Kaliumchlorid (KCl) in der verwendeten Konzentration unterdrückt die Hyperpolarisation der Zellmembran und unterdrückt dadurch die Wirkung von EDHF.

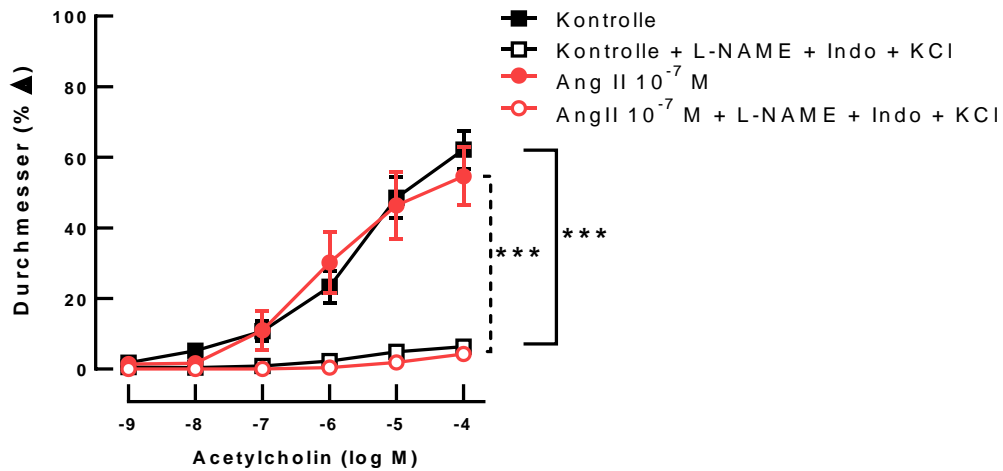


Abbildung 13: Blockade aller bekannten vasodilatativen Wege an der *A. ophthalmica*

Der bei Blockade der Vasodilatation durch L-NAME und Indomethacin verbleibende vasodilatative Effekt der endothelvermittelten Vasodilatation wird nach aktuellem Wissensstand durch EDHF vermittelt. Um dies nachzuweisen sowie ggf. noch unbekannte kompensatorische Mechanismen auszuschließen, wurde die kombinierte Blockade mit Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) +L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + KCl ($c=30$ mmol/l) durchgeführt. Hierbei wurde die vasodilatative Antwort sowohl in der mit Kontrollmedium, als auch in der mit Ang II inkubierten Gruppe komplett aufgehoben (vgl. Abb. 13, $n=8$, Signifikanzniveau *** $p<0,001$). Dies zeigt einerseits die Beteiligung von EDHF, andererseits wurde so die Beteiligung weiterer Mechanismen ausgeschlossen.

e) Prüfung des Cytochrom P450- (CYP450)-abhängigen Weges des EDHF-Zweiges.

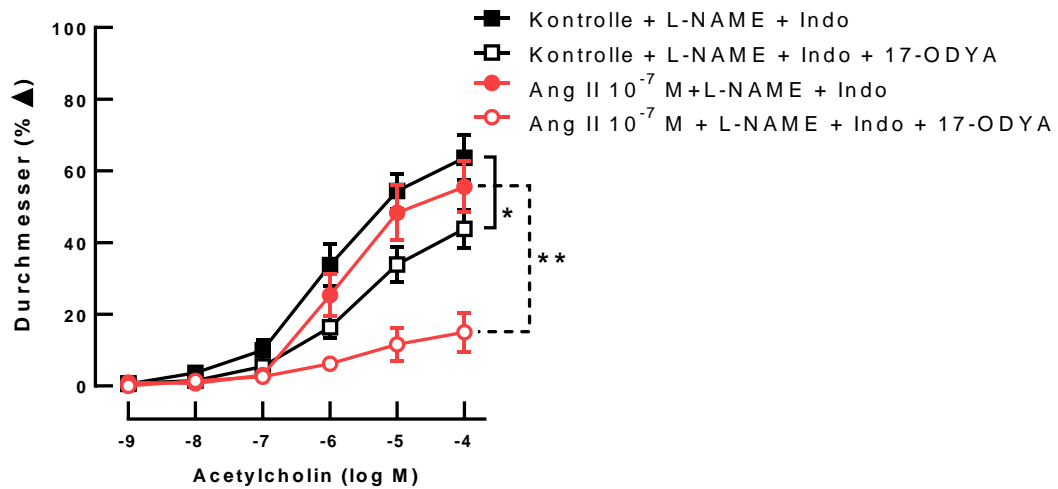


Abbildung 14: Untersuchung der CYP450 abhängigen EDHF-Mechanismen

Durch kombinierte Blockade mit L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) +17-ODYA ($c=10^{-5}$ mol/l) wird der Cytochrom P450-abhängige Weg des EDHF blockiert. Die verbleibenden HEETA und THETA sind Endprodukte des LOX-abhängigen Weges der endothelabhängigen Vasodilatation. Es zeigte sich in der Kontrollgruppe eine moderat reduzierte Vasodilatation (vgl. Abb 14, schwarze Kurven, $n=8$, Signifikanzniveau * $p<0,05$). In der Ang II-Gruppe zeigte sich dagegen eine fast vollständig aufgehobene vasodilatative Antwort (vgl. Abb. 14 Kurve dargestellt mit roten Kreisen, $n=8$, Signifikanzniveau ** $p<0,01$). Damit konnte eine geringe Beteiligung der LOX-abhängigen Produkte an der cholinergen endothelabhängigen Vasodilatation bei endothelialer Dysfunktion nachgewiesen werden.

f) Prüfung des Lipoxigenase- (LOX)-abhängigen Weges des EDHF-Zweiges.

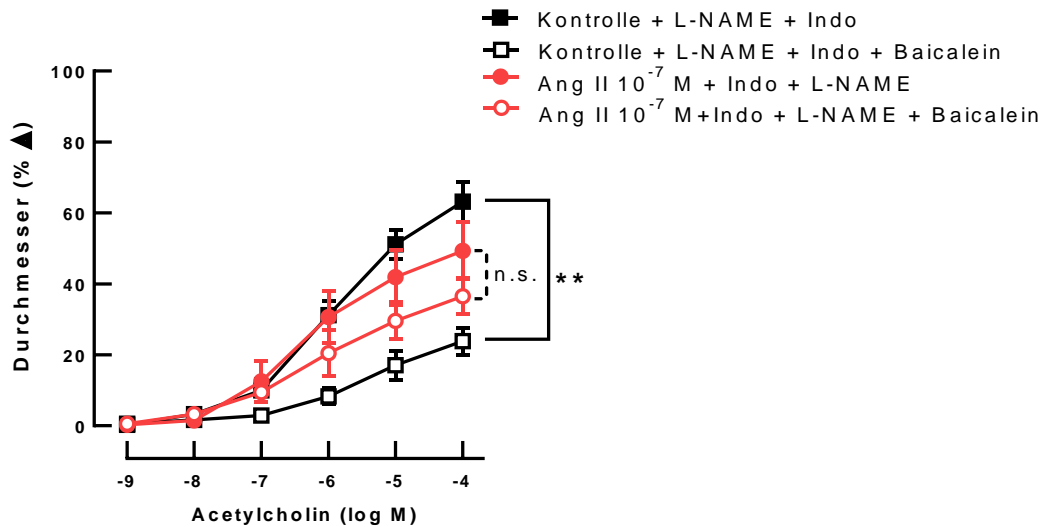


Abbildung 15: Untersuchung der LOX-abhängigen EDHF-Mechanismen

Durch kombinierte Blockade von L-NAME ($c=10^{-4}$ mol/l) + Indomethacin ($c=10^{-5}$ mol/l) + Baicalein ($c=10^{-5}$ mol/l) wird der LOX-abhängige Weg blockiert und damit der CYP450-abhängige Weg der endothelabhängigen Vasodilatation geprüft. Bei den CYP450-abhängigen Endprodukten handelt es sich um Epoxyeicosatriensäuren (EET's). Bei den im Kontrollmedium inkubierten Gefäßen zeigten eine signifikant verminderte vasodilatative Antwort (vgl. Abb. 15 schwarze Kurven; $n=8$, Signifikanzniveau ** $p<0,01$). Die in Ang II inkubierten Gefäße zeigten dagegen keine statistisch signifikante Veränderung der vasodilatativen Antwort (Abb. 15 rote Kurven). Dies spricht für eine hauptsächliche Vermittlung der cholinergen endothelabhängigen Vasodilatation bei endothelialer Dysfunktion durch CYP450-abhängige Produkte.

5.2.4. Prüfung, ob die endotheliale Dysfunktion in der Arteria ophthalmica durch Hyperoxide verursacht wird

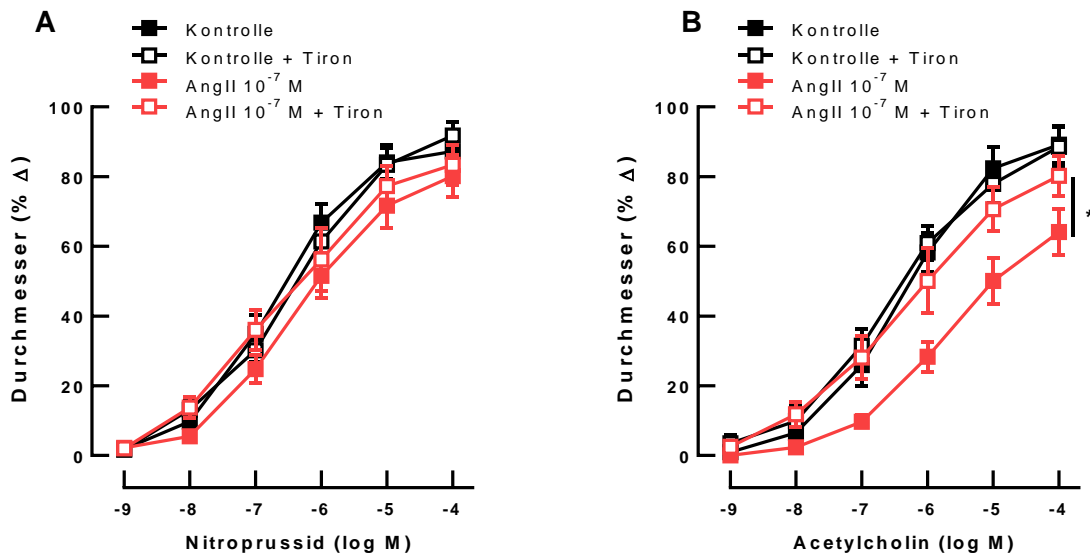


Abbildung 16: Untersuchung der Beteiligung von Hyperoxide. Vergleichend endothelunabhängige (A) gegen endothelabhängige (B) vasodilatative Mechanismen

Um die endotheliale Dysfunktion durch Hyperoxide im funktionellen Experiment nachzuweisen, wurden die Gefäße zusätzlich mit Tiron, einem Radikalfänger für Hyperoxide inkubiert. Tiron konnte in bisherigen Experimenten eine durch Ang II-induzierte endotheliale Dysfunktion rückgängig machen [28]. Es zeigte sich bei Versuchen in der Kontrollgruppe nach Inkubation mit Tiron kein Einfluss auf die vasodilatative Antwort. Weder auf die endothelunabhängige Antwort mit Nitroprussid noch auf die endothelabhängige mit ACh (vgl. Abb. 16 A + B schwarze Kurven). Eine andere Antwort zeigte sich bei der Gruppe in Ang II inkubierten Gefäßen. Es zeigte sich keine Veränderung in der vasodilatativen Antwort auf Nitroprussid (vgl. Abb. 16 A), aber eine signifikant reduzierte vasodilatative Antwort auf ACh (vgl. Abb. 16 B rote Kurven, $n=8$, Signifikanzniveau $* p<0,01$). Nach Inkubation mit dem Radikalfänger Tiron zeigte sich die vasodilatative Antwort auf ACh in der Gruppe mit Ang II inkubierten Gefäße komplett erholt (vgl. Abb. 16 B rote Kurven, $n=8$, Signifikanzniveau $p<0,05$). Damit konnte in funktionellen Experimenten nach Inkubation mit Ang II eine endotheliale Dysfunktion mit Fehlen der NO-abhängigen Vasodilatation nachgewiesen. Die vollständige Wiederherstellung der Vasodilatation durch Abfangen der Sauerstoffradikale konnte gezeigt werden. Damit konnte durch Tiron die Auflösung des oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Die endothelunabhängige Vasodilatation konnte durch Zufuhr des Vasodilatators NO mit Hilfe von Nitroprussid als unbeeinträchtigt dargestellt werden. Es handelt sich bei durch Ang II-induziertem oxidativen Stress somit um eine endotheliale Dysfunktion.

5.3. NOX-Typisierung

5.3.1. PCR: Messenger RNA-Expression

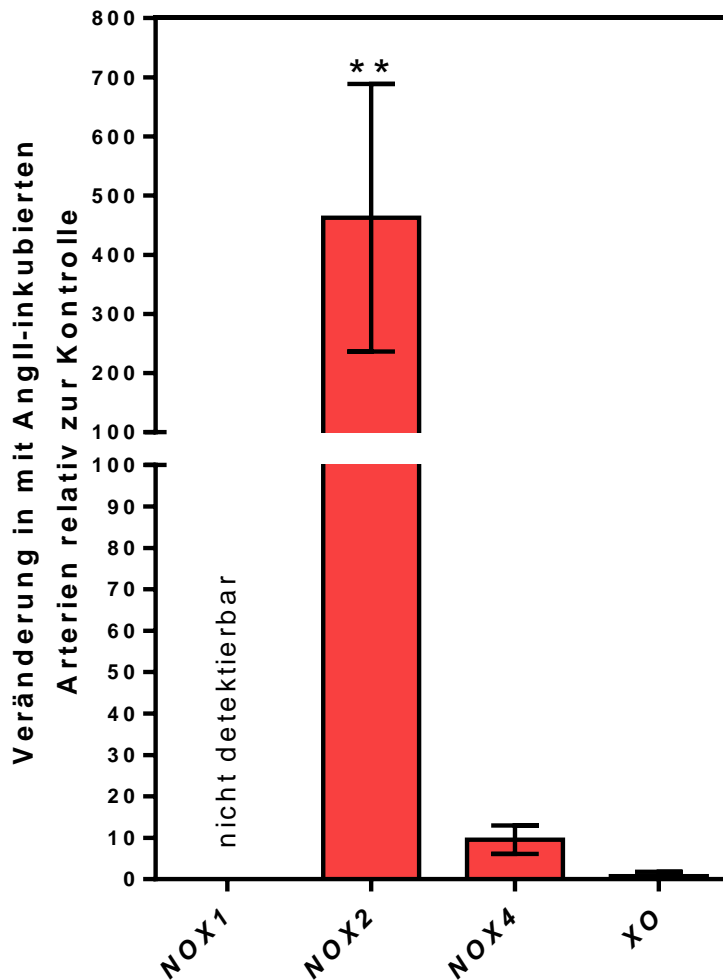


Abbildung 17: Säulendiagramm Darstellung Zunahme NOX-RNA nach Inkubation mit Ang II im Vergleich zur Kontrollgruppe

Um eine Veränderung in den NO-Oxygenasen bei oxidativem Stress nachzuweisen, führten wir eine PCR der inkubierten Gefäße auf die Redox-Gene NOX1, NOX2, NOX4 und Xanthin Oxidase (XO) durch. Die Inkubation mit Ang II (10^{-7} mol/l) zeigte eine deutlich hohe Expression von NOX2-mRNA. NOX1-mRNA war nicht nachweisbar. NOX4-mRNA und XO-mRNA war nur gering nachweisbar. XO entsteht durch Umwandlung der Xanthindehydrogenase im Falle von Hypoxie oder Inflammation [135]. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war NOX4- und XO-mRNA nur gering erhöht. NOX2-mRNA zeigte sich dagegen deutlich erhöht. Es konnte damit eine erhöhte NOX-2-Expression, verursacht durch Ang II-ausgelöstem oxidativen Stress nachgewiesen werden.

5.3.2. Immunfluoreszenzfärbung: Quantifikation der NOX2-Menge

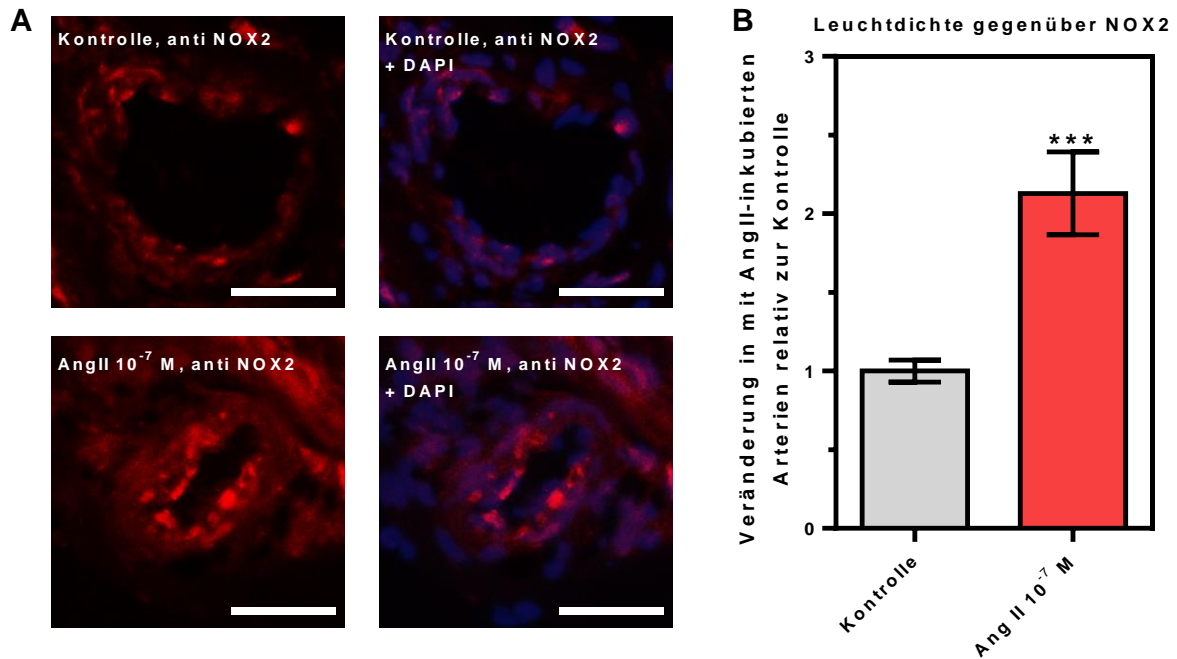


Abbildung 18: A) Abbildung Gefäßschnitte mit anti-NOX2-Antikörperfärbung; B) Säulendiagramm: Quantitative Auswertung der Leuchtdichte

In Abb. 18A sind Gefäßschnitte nach Inkubation mit anti-NOX2-Antikörpern abgebildet. Es zeigt sich in der Färbung mit anti-NOX2-Antikörpern eine deutlich stärkere Anfärbbarkeit nach Inkubation der Gefäße mit Ang II im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) dient zur Markierung von DNA und erleichtert dadurch die Orientierung innerhalb der Struktur der Schnitte. Die Reaktivität ist hochsignifikant (Vgl. Abb. 18B, jeweils $n=8$ pro Gruppe, Signifikanzniveau $p<0,001$). Somit konnte eine signifikante Erhöhung der Immunreaktion mit NOX2 im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Dies weist auf eine Hochregulation der NOX2, durch Ang II, auch auf der Ebene der Proteinsynthese hin.

6. Diskussion

Es wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1. Ang II verursacht oxidativen Stress in der Gefäßwand der A. ophthalmica
2. Oxidativer Stress resultiert in einer reduzierten Vasodilatation aufgrund endothelialer Dysfunktion
3. Ang II-vermittelter oxidativer Stress wird durch den AT₁-Rezeptor vermittelt
4. Durch Ang II-vermittelter oxidativer Stress verursacht eine erhöhte Expression von NOX2 in der Gefäßwand
5. Oxidativer Stress und die Rolle von NO und Prostaglandin in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen
6. Oxidativer Stress und die Rolle der EDHF's in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen
 - a) CYP-450
 - b) LOX
7. Relevanz und Einordnung Ergebnisse in bisherige Forschungsergebnisse

6.1. Angiotensin II verursacht oxidativen Stress in der Gefäßwand der Arteria ophthalmica

Die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sowohl in Hinblick auf die pathologische als auch auf die physiologische Rolle wurden seit Entdeckung des RAAS ausgiebig erforscht. Durch Ang II wird auch oxidativer Stress vermittelt, welcher sowohl eine Rolle in der physiologischen Regulation der Redox-Signalwege als auch in vielen pathologischen Situationen [136] und im Alterungsprozess spielt [9]. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, erstmalig den Effekt von Ang II auf die Reaktivität der murinen A. ophthalmica zu untersuchen. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Vasodilatation sowie den zugrunde liegenden Mechanismen.

Effekte durch Veränderungen des Ang II-Spiegels im Blut wurden bisher in verschiedenen Organen untersucht und beschrieben. Insbesondere das systemische RAAS mit vasokonstriktiver Wirkung und damit Beteiligung an der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes und des Blutdrucks fand bereits viel Beachtung. Angiotensin kann neben seiner systemischen

Wirkung als Regulator des Blutdrucks auch direkt lokale Wirkungen entfalten. Zum Beispiel konnte durch Didion et al. eine reduzierte endothelabhängige Gefäßantwort bei lokaler Wirkung von Ang II gezeigt werden. Diese konnte unabhängig von systemischer Ang II-Gabe erzeugt werden [11]. Ang II vermittelt seine vasokonstriktorische Wirkung in den zerebralen Arterien direkt über die Aktivierung des AT₁-Rezeptors [54]. Gefäßstudien mit Ang II an Mäusen wurden bisher vor allem an gut zugänglichen zerebralen Arterien und der Aorta durchgeführt [70, 137]. Eine isolierte Untersuchung der Effekte von Ang II an der A. ophthalmica der Maus ist bisher noch nicht erfolgt.

In dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt der Effekt von Ang II in funktionellen Experimenten auf die Vasodilatation der murinen A. ophthalmica untersucht. Im nächsten Schritt erfolgte der Versuch entstehenden oxidativen Stress durch Anfärbung zu quantifizieren. Der Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) wird vor allem durch zelluläres O²⁻ und teils durch ·OH und H₂O₂ in die fluoreszierende Form Ethidium umgewandelt [138]. In der vorliegenden Arbeit konnte nach in vitro-Inkubation mit Ang II im Vergleich zum Kontrollmedium eine signifikant stärkere Anfärbung in der Gefäßwand gezeigt werden. Damit ließen sich lokal in der Gefäßwand vermehrt Sauerstoffradikale, vor allem O²⁻, nach in vitro Inkubation in Ang II nachweisen. Erhöhte Mengen von Ang II im Blutsystem konnten auch in anderen Arbeiten mit vermehrtem oxidativem Stress und Einschränkung der endothelialen Funktion der Gefäße in Verbindung gebracht werden [57, 58]. Die Minderung der endothelabhängigen Vasodilatation konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, jedoch im Vergleich zu den Arbeiten von Didion et. al. mit Kaninchen [11], wurde in dieser Arbeit eine deutlich höhere Konzentration an Ang II benötigt, um eine endotheliale Dysfunktion auszulösen. Eine pathophysiologisch relevante Rolle für die lokale Wirkung von Ang II an der A. ophthalmica kann damit aber nicht ausgeschlossen werden. Vielmehr muss hier eine klare Differenzierung erfolgen. Denn ergänzend zum systemischen RAAS wurde auch ein lokales RAAS in verschiedenen Geweben, u. a. direkt in okulärem Gewebe beschrieben [61]. Das lokale okuläre RAAS besitzt eigene Enzyme und kann damit beinahe unabhängig vom systemischen RAAS agieren. Beobachtet wurde aber eine Modulation durch das systemische RAAS [139]. Auch dagegen muss noch die lokale Wirkung von Ang II genauer abgegrenzt werden. Die systemische, vor allem vasokonstriktorische Wirkung und Blutdruckregulation über AT₁-Rezeptoren steht entgegen der lokalen postrezeptorabhängigen Wirkung im Gewebe durch direkte Aktivierung der AT-Rezeptoren sowie der lokalen Wirkung des durch Aktivierung von NOX erzeugtem oxidativem Stress. Oxidativer Stress kann über die chemische Reaktion zwischen NO und O²⁻ und die dadurch verminderte Verfügbarkeit des Vasodilatators NO zu einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation führen [140]. Bei chronischem oxidativen Stress kann es zu einer eNOS-Entkopplung, damit zu einer vermehrten Produktion

von Hydroperoxiden statt NO und somit zu einem Teufelskreis mit wiederum vermehrtem oxidativem Stress kommen. Auch haben Zerebralarterien im Vergleich zu systemischen Arterien die Möglichkeit deutlich höhere Spiegel an ROS zu produzieren [63]. Dagegen haben einige reaktive Sauerstoffspezies in niedrigen Konzentrationen auch eine vasodilatativ regulatorische Funktion in Zerebralarterien [54].

An zerebralen Gefäßen ist der Effekt von vermehrt ROS nach Inkubation mit Ang II bekannt und wurde in Mäusen [54] und Ratten beschrieben [141]. Eine Arbeit von Didion et al. konnte 2003, bei Beobachtung der Gefäße mit einer Mikroskopkamera durch ein Knochenfenster zeigen, dass die lokale Applikation von Ang II konzentrationsabhängig die Vasodilatation von zerebralen Arterien hemmt. Die Untersuchung erfolgte an Kaninchen in vivo. Die Applikation von Ang II erfolgte aber lokal in das Knochenfenster. Dabei konnte die vermehrte Produktion von oxidativem Stress durch Ang II nachgewiesen werden [11]. In 2006 wurde durch Girouard und Kollegen in vivo, durch ein Knochenfenster Effekte von Ang II auf zerebrale Gefäße der Maus beobachtet. Die Gabe von Ang II erfolgte intravenös und wirkte demnach systemisch. Gemessen wurden Gefäße über dem somatosensorischen Cortex mittels einer Laser-Dopplerprobe. Auch in dieser Arbeit konnte eine reduzierte endotheliale Regulation der zerebralen Gefäße aufgrund vermehrtem oxidativen Stress nachgewiesen werden [67]. Durch Chrissobolis et al. konnte 2012, nach systemischer Applikation von Ang II mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe, in funktionellen Experimenten an der A. basilaris der Maus eine Erhöhung der ROS-Spiegel in der Gefäßwand gezeigt werden. Die Menge an ROS war doppelt so hoch wie in der Vergleichsgruppe. Auch die Vasodilatation zeigte sich deutlich reduziert [142].

Ein bisher nicht erwähnter Aspekt des oxidativen Stresses ist die Beteiligung von Immunzellen an der veränderten Vasoregulation und Gefäßumbauprozessen. Bei in vivo-Experimenten zeigte sich eine Korrelation des von Ang II-induzierten Gefäßstresses und Menge an NOX2 mit dem Vorhandensein des Darmmikrobioms. Hierbei wurde bei Mäusen ohne Darmmikrobiom ein deutlich geringerer Gefäßstress als in einer Vergleichsgruppe mit vorhandenem Mikrobiom festgestellt. Die Untersuchung erfolgte an Aortenringen [143]. Daher geht man von einer Assoziation von einwandernden Immunzellen mit oxidativem Stress und veränderter Gefäßfunktion aus. Die wichtige Rolle der ROS wurde in vielen kardiovaskulären Erkrankungen wie Bluthochdruck, Kardiomyopathie und koronarer Herzkrankheit gezeigt [144]. Dieser Effekt wurde daher v.a. unter kardiologischen Schwerpunkten intensiv in vivo untersucht [144]. Bei Z. n. Herzinfarkt kommt es im Tiermodell zur Einwanderung von Immunzellen und pathophysiologisch relevantem Umbau der Herz- und Gefäßstruktur und daraus resultierend zu Herzinsuffizienz. Diese hierbei entstandene endotheliale Dysfunktion wurde im Mausmodell durch Vermittlung und Einwanderung von NOX2+ myeloischen Zellen

in die Gefäßwand gezeigt [145]. Die Endotheliale Dysfunktion konnte durch Gabe des AT₁-Rezeptor-Blockers Telmisartan reduziert werden und zeigte im Mausmodell eine deutliche Verbesserung der Gefäßfunktion [145]. Die Hauptquelle für ROS im kardiovaskulären System sind NADPH Oxidasen, welche auch bei Immunzellen vorhanden sind, und dabei auch vermehrt aktiviert werden. Für Herzversagen nach einem Herzinfarkt konnte im Tierexperiment die Einwanderung von entzündlichen NOX2-positiven Knochenmarkzellen in die Gefäßwand gezeigt werden. Durch Blockade des AT₁-Rezeptors zeigte sich im Tierexperiment ein protektiver Effekt [145]. Ein weiteres Tiermodell zur Untersuchung von NOX2-vermitteltem oxidativem Stress sind Mäuse ohne Ausbildung des Enzyms α 1AMPK. Diese Mäuse sind durch endotheliale Dysfunktion und NOX2-vermitteltem oxidativem Stress charakterisiert. Daher schreibt man dem Enzym α 1AMPK eine protektive Schlüsselrolle zu [146]. Auf die Untersuchung der NOX-vermittelten Effekte wird noch in Punkt 4 dieser Diskussion eingegangen.

Entgegen diesen Tiermodellen wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die Inkubation und die folgenden Experimente nur in vitro durchgeführt. Eine Aussage über die vermittelnden Effekte direkt am Gefäß konnte mit in vivo-Experimenten bisher nicht erfolgen. Dagegen wurde in den Experimenten dieser Arbeit erstmalig oxidativer Stress durch Ang II in vitro an der A. ophthalmica nachgewiesen. Dies erfolgte sowohl optisch quantifizierbar in der Fluoreszenzfärbung mit Nachweis von vermehrtem oxidativem Stress in der Gefäßwand. Aber es konnte auch in den funktionellen Experimenten nach Inkubation mit Ang II in der Konzentration von 10^{-7} mol/l eine Reduktion der Vasodilatation auf ACh gezeigt werden. Es gelang nach Blockade mit Tiron, einem Radikalfänger, die reduzierte Vasodilatation rückgängig zu machen. Damit konnte erstmalig bei einem in vitro-Modell der A. ophthalmica der Nachweis für ROS mittels funktioneller Experimente erbracht werden.

Durch diese Arbeit kann keine Aussage auf Effekte in vivo, vor allem keine Aussage, auf die weiter oben beschriebenen systemischen Effekte durch Aktivierung von Immunzellen gegeben werden. Auch die Wirkung von lokalem RAAS des retrobulbären oder des okulären Gewebes können bei in vitro Experimenten nicht untersucht werden. Um chronische Effekte von oxidativem Stress und Zusammenhänge der Effekte erklären zu können, sind weitere Experimente nötig. Die durch NOX2 vermittelte Aktivierung von Immunzellen würde einen Umbau der Gefäßwand erzeugen, der durch Hinzugabe eines Radikalfängers höchstwahrscheinlich nicht reversibel ist. Jedoch konnte durch die funktionellen Experimente dieser Arbeit die Veränderungen auf die Postrezeptormechanismen der endothelabhängigen Vasodilatation untersucht werden. Die Aussagen der Ergebnisse hierzu werden folgend diskutiert.

6.2. Oxidativer Stress resultiert in einer reduzierten Vasodilatation aufgrund endothelialer Dysfunktion

Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille führt bereits eine geringe Reduktion des Gefäßdurchmessers zu einer deutlichen Erhöhung des Gefäßwiderstandes. Auch eine nur gering reduzierte Vasodilatation kann somit zu Minderperfusion des nachfolgenden Gewebes führen. Die endothelabhängige Vasodilatation hat zunehmende Relevanz mit abnehmendem Gefäßdurchmesser. Bei der A. ophthalmica ist primär von einer endothelial vermittelten Vasodilatation auszugehen [29]. Der Hauptvasodilatator in der humanen A. ophthalmica ist Stickstoffmonoxid (NO) [147]. In der Vasodilatation der murinen A. ophthalmica wird die Vasodilatation jedoch hauptsächlich über Arachidonsäure-Metaboliten vermittelt [29]. Im Fall des vollständigen Fehlens von NO konnte an der A. ophthalmica mit Hilfe von eNOS-Knockout-Mäusen eine alleinige Vermittlung der Vasodilatation durch EDHF gezeigt werden [42].

In den Experimenten dieser Arbeit konnte erstmalig in vitro, isoliert an der murinen A. ophthalmica, eine reduzierte cholinerge Vasodilatation aufgrund Ang II-induzierten oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Diese zeigte sich in den Experimenten nach Inkubation mit Ang II in der Konzentration 10^{-7} mol/l. Oxidativer Stress konnte sowohl in der Färbung mit DHE als auch im funktionellen Experiment durch Wiederherstellung der Gefäßfunktion nach Inkubation mit Tiron, einem Radikalfänger, nachgewiesen werden. Auch konnte die reduzierte Vasodilatation durch Hinzufügen von Nitroprussid, einem Vasodilatator der unabhängig vom endotheleigen produzierten NO ist, normalisiert werden. Bei Ausfall der endothelial vermittelten Vasodilatation ist von endothelialer Dysfunktion zu sprechen. Eine endotheliale Dysfunktion konnte bisher lokal, direkt an der A. ophthalmica und unabhängig von systemischen Effekten, nicht nachgewiesen werden. Bisherige Untersuchungen konnten bereits eine durch Ang II-induzierte Reduktion der endothelialen Vasodilatation zeigen sowie beteiligte Mechanismen offenlegen [11, 67, 142]. Jedoch wurden diese Arbeiten an ungleichen Versuchsmodellen und Gefäßbetten durchgeführt. Eine klare Aussage auf die A. ophthalmica lässt sich damit nicht gewinnen. Des Weiteren konnten lediglich Hinweise auf die Vermittlung des oxidativen Stresses gezeigt werden. Nachweise über die lokalen Effekte am Endothel und die Wirkung auf Postrezeptormechanismen sind so nicht möglich. Da sowohl zwischen verschiedenen Organismen als auch in verschiedenen Gefäßbetten teils große Unterschiede in der Vermittlung der Vasodilatation bestehen, ist eine genaue Untersuchung aber nötig.

6.3. Angiotensin II-vermittelter oxidativer Stress wird in der *A. ophthalmica* durch den AT₁-Rezeptor vermittelt

Bereits 1991 wurden ein AT₁- und ein AT₂-Rezeptor isoliert, welche die Wirkungen von Ang II vermitteln. Wirkungen an Gefäßen der Maus werden dem AT₁-Rezeptor zugeschrieben. Hiervon gibt es zwei Subtypen, die jedoch aufgrund des sehr ähnlichen Rezeptoraufbaus nur mit gentechnisch veränderten Mäusen genauer untersucht werden können. Die meisten Quellen gehen in Mäusen von einer Hauptrolle von AT_{1A} für die Gefäßantwort auf Ang II aus [148]. Beispielsweise wurde der AT_{1A}-Rezeptor in vielen Gewebearten (u. a. in der glatten Muskulatur der Gefäße, Endothel, Herz, Gehirn, ...) nachgewiesen [68]. Der AT_{1B}-Rezeptor ist vor allem für die Regulation des Durstgefühls wichtig und findet sich zum größten Teil an der Nebenniere und im zentralen Nervensystem. Aktuell geht man beim AT_{1A}-Rezeptor der Maus von der größten Ähnlichkeit zum humanen AT₁-Rezeptor aus [68]. Angiotensin-Rezeptoren konnten bei der Katze und dem Rind an Blutgefäßen, welche die Netzhaut und den Sehnervenkopf versorgen, nachgewiesen werden [149, 150]. Bei der Untersuchung von durch Ang II-vermittelten Effekten an zerebralen Gefäßen bemerkten Girouard et al. neben der reduzierten endothelialen Regulation durch oxidativen Stress auch die Verhinderung des Effektes durch Gabe von Losartan, einem AT₁-Rezeptor-Blocker. Daher wurde hier bereits die Vermittlung dem AT₁-Rezeptor zugeschrieben [67].

Die Aktivierung des AT₁-Rezeptors wurde auch in vielen relevanten pathophysiologischen Mechanismen an Geweben und Gefäßzellen des Auges gezeigt. Zum Beispiel konnte in Modellen für diabetische Retinopathie die Proliferation und Migration von Zellen der glatten Muskulatur an Ziliararterien [73] sowie VEGF-induziertes Wachstum und Migration von Endothelzellen an retinalen Gefäßen gezeigt werden [151, 152]. Bekannt ist auch die AT₁-Rezeptor-vermittelte Aktivierung NF-κB-vermittelter proinflammatorischer Signalwege bei diabetischer Retinopathie [132]. Es konnte durch Ang II die Aktivierung von NADPH-Oxidasen im Sinne einer verstärkten Expression und katalytischen Aktivität beobachtet werden. NADPH-Oxidasen produzieren Hyperoxide (ROS) und Wasserstoffperoxid [68]. Über die Aktivierung des AT₁-Rezeptors kann durch komplexe transkriptionelle oder posttranskriptionelle Mechanismen aber auch die Expression von AT₁-Rezeptoren selbst beeinflusst werden [68]. Die für diese Arbeit vielleicht relevanteste Bedeutung von Ang II ist jedoch die aufgrund oxidativen Stresses über den AT₁-Rezeptor vermittelte endotheliale Dysfunktion [68].

In dieser Arbeit konnte in vitro an der *A. ophthalmica* der Maus eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden. Diese wurde durch Ang II vermittelten oxidativem Stress erzeugt. Die Blockade des AT₂-Rezeptors mit Hilfe von PD123319 Ditrifluoracetat zeigte keine Veränderung der Vasodilatation. Dagegen konnte die reduzierte Vasodilatation mit Hilfe des

AT₁-Rezeptorblockers Candesartan wieder normalisiert werden. Somit konnte erstmalig in-vitro der AT₁-Rezeptor als Hauptmediator für durch Ang II-vermitteltem oxidativem Stress an der A. ophthalmica der Maus nachgewiesen werden. Bei der lokalen Wirkung von Ang II handelt es sich an der A. ophthalmica also um eine direkt rezeptorvermittelte Wirkung.

6.4. Durch Angiotensin II-vermittelter oxidativer Stress verursacht eine erhöhte Expression von NOX2 in der Gefäßwand

Ang II konnte bereits in anderen Gefäßen als der A. ophthalmica als Verursacher von oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion gezeigt werden. Der wichtigste Vasodilatator in vielen peripheren Gefäßen ist NO. NO wird durch NO-Synthasen produziert, welche in 3 Isoformen vorkommen. Die für die Vasodilatation wichtigste Isoform, die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist für die Regulation des Gefäßtonus von hoher Bedeutung. Pathophysiologisch kommt der eNOS eine sehr hohe Relevanz zu, da viele kardiovaskuläre Risikofaktoren zu oxidativem Stress, eNOS-Entkopplung und endothelialer Dysfunktion führen [35]. Im Tiermodell der Ratte konnten in einem Diabetes-Modell sowohl die Bedeutung der eNOS für die durch Förstermann beschriebenen Effekte gezeigt werden als auch diese durch Gabe von Atorvastatin aufgehoben werden [153].

Durch Ang II konnte eine Stimulation von O₂⁻ und H₂O₂ produzierenden NADPH-Oxidasen gezeigt werden [52]. In Zellkulturen der Endothelzellen der Aorta wurde die Vermittlung von Ang II-vermitteltem oxidativem Stress durch den Subtyp NOX2 gezeigt [68]. Bei Chrissobolis et al. konnte 2012 eine Erhöhung der Menge an ROS in der Gefäßwand der A. basilaris nach Ang II Gabe nachgewiesen werden. Bei NOX2-Knockout-Mäusen konnte dieser Effekt jedoch nicht gezeigt werden [142]. Auch durch Girouard [67] konnte bei intravenös injiziertem Ang II neben der reduzierten Vasodilatation auch deren Vermittlung durch den AT₁-Rezeptor und eine NOX2-enhaltende NADPH-Oxidase gezeigt werden. Als ursächlich für Ang II vermittelte Effekte konnte in vivo im Mausmodell der Nachweis für Lysozym M-positive Monozyten erbracht werden. Die Effekte konnten dagegen bei Knockout Mäusen mit Fehlen dieser Zellen nicht nachgewiesen werden. Durch Transfer der Lysozym M-positiven Monozyten konnten, die durch Ang II vermittelten, pathologische Effekte wiederhergestellt werden. Jedoch nur bei transferierten Zellen die den AT₁-Rezeptor und die NOX2 enthielten [66]. Vieles spricht also für eine Beteiligung des Ang II/ NOX2-Weges an den durch Ang II vermittelten Effekten der Vasodilatation. Direkt an der A. ophthalmica konnte dieser Effekt bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte somit erstmalig in einem in vitro-Modell der A. ophthalmica sowohl histologisch mit Hilfe der Antikörper-Färbung als auch durch die RT-PCR, die vermehrte

Expression von NOX2 bei durch Ang II-induziertem oxidativem Stress an der A. ophthalmica der Maus nachgewiesen werden. Effekte, die bisher lediglich vermutet wurden, konnten dadurch lokal an der A. ophthalmica bestätigt und histologisch nachgewiesen werden. Damit könnten sich zukünftige therapeutische Optionen ergeben. NOX2 und endotheliale Dysfunktion in den okulären Gefäßen konnte durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adrian Gericke im Tiermodell mit mehreren Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Gezeigt werden konnten NOX2-vermittelte vaskuläre Effekte für Glaukom und Ischämie-Reperfusionserkrankung sowie für akutes Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) und Hypercholesterinämie [154].

6.5. Oxidativer Stress und die Rolle von NO und Prostaglandin in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen

Die wichtigsten endothelialen vasodilatativen Faktoren sind neben NO, der endothelabhängige hyperpolarisierende Faktor (EDHF) und Prostazyklin (PGI_2) [155]. Durch Manicam et al. konnte 2016 gezeigt werden, dass Prostazyklin nicht an der cholinergen Vasodilatation der murinen A. ophthalmica beteiligt ist [29]. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich weder in der Kontrollgruppe noch in der mit Ang II-inkubierten Gruppe eine signifikante Reduktion der Vasodilatation nach Blockade der Prostazykline. An der A. ophthalmica konnte somit auch in dieser Arbeit keine Beteiligung von Prostazyklin an der cholinergen Vasodilatation der murinen A. ophthalmica gezeigt werden. Auch zeigte sich keine Kompensation durch Prostazyklin bei oxidativem Stress. Beim Menschen wird der Prostaglandinsynthese eine wichtigere Beteiligung an der Vasodilatation zugeschrieben. Eine Studie aus dem Jahr 1982 konnte an den Pulmonalarterien eine Vasodilatation durch Prostazyklin nachweisen [156]. Eine Bedeutung wird auch in der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) diskutiert. Eine therapeutische Relevanz wird z. B. in der S3-Leitlinie „Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK), Diagnostik, Therapie und Nachsorge“ (Stand 30.11.2015) beschrieben. Die Gabe des Prostaglandinderivates PGE-1 konnte in Studien eine Reduktion der Ulcusgröße sowie der Beinerhaltungs- und Überlebensrate bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) zeigen. Ein Langzeitnutzen oder eine Senkung der kardiovaskulären Sterblichkeit konnte jedoch nicht gezeigt werden. Daher und aufgrund neuerer Studien ohne nachgewiesenen positiven Effekt wurde auch nur ein Empfehlungsgrad 0, also eine offene Empfehlung, ausgesprochen.

Die Hauptrolle der cholinergen Vasodilatation in vielen kleinen Gefäßen wird Stickstoffmonoxid (NO) zugeschrieben. Aufgrund seiner wichtigen Rolle in der endothelabhängigen Vasodilatation kann NO, unter physiologischen Bedingungen, auch als Beschützer der Gefäßwand bezeichnet werden. In der A. ophthalmica im Menschen konnte NO als

Hauptvasodilatator der cholinergen Vasodilatation ermittelt werden [157]. Der Nachweis, der durch eNOS vermittelten NO-abhängigen Vasodilatation an der A. ophthalmica der Maus konnte durch Laspas et al. erbracht werden [15]. An der A. ophthalmica der Maus macht die durch NO-vermittelte Vasodilatation jedoch nur etwa 30 % der cholinergen Vasodilatation aus [29]. Unter pathologischen Bedingungen kann NO sowohl durch direkte Reaktion mit Sauerstoffradikalen als auch durch Entkopplung der eNOS vermindert werden [18]. Eine Entkopplung der NOS entsteht im Falle eines Mangels des Kofaktors Tetrahydrobiopterin [68] und resultiert in einer verstärkten Produktion von Hydroxylradikalen. Dieser englisch ‚eNOS-uncoupling‘ (eNOS-Entkopplung) genannte Effekt kann damit zu einem Teufelskreis mit vermehrtem oxidativem Stress führen. Veränderungen der vaskulären NO-Produktion an der Retina und am Sehnervenkopf wurden u. a. mit Glaukom in Verbindung gebracht. Noch ist die Relevanz eines chronischen Ausfalles der NOS an der A. ophthalmica jedoch unklar. Durch Laspas et al. konnte bei Ausfall einer einzelnen NOS-Isoform keine Veränderung auf Tensiwerte oder Veränderung der Neuronendichte in der retinalen Ganglienzellschicht gezeigt werden [15]. Es wurde daher eine Kompensation durch NOS-unabhängige Mechanismen postuliert. Andererseits konnte durch Mentek et al. 2018 in einem intermittierendem Hypoxiemodell, als Abbildung einer Schlafapnoe im Tiermodell, eine deutliche Hochregulation von eNOS, nNOS und iNOS am Sehnerv gezeigt werden [30]. Dieser Effekt konnte auch an Glaukom-Patienten nachgewiesen werden [158]. Eine reduzierte NOS-Aktivität wird aber mit dem Zelltod von retinalen Ganglienzellen in Verbindung gebracht [159]. Die überwiegende Mehrheit der bisherigen Beobachtungen geht von einer Hauptrolle durch eNOS in der endothelabhängigen Regulation des Gefäßtonus aus [15].

An der A. ophthalmica der Maus konnte für NO sowohl der Nachweis einer Beteiligung von ca. 30 % an der Vasodilatation gezeigt werden [29], als auch bei Ausfall der eNOS die alleinige Kompensation der Vasodilatation durch EDHF-abhängige Mechanismen [42]. Die Beteiligung der NOS an der Vasodilatation bei oxidativem Stress an der A. ophthalmica konnte bisher nur von anderen Gefäßbetten vermutet werden, wurde jedoch bisher nicht nachgewiesen. In den Versuchen dieser Arbeit konnten somit erstmalig die Mechanismen aufgeschlüsselt werden. Es konnte sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der mit Ang II-inkubierten Gruppe eine deutlich reduzierte Vasodilatation nach Blockade der NO-abhängigen Wege gezeigt werden. In der mit Ang II inkubierten Gruppe zeigte sich aber keine signifikante Änderung der Vasodilatation nach zusätzlicher Blockade des NO-abhängigen Weges. Der NO-abhängige vasodilatative Weg ist daher bei durch Ang II-vermitteltem oxidativem Stress nicht relevant an der Vasodilatation der A. ophthalmica beteiligt. Nach Gabe von externem NO zeigte sich jedoch eine komplett erholte

Vasodilatation. Damit gelang der Nachweis der erhaltenen NO-abhängigen vasodilatativen Postrezeptormechanismen, jedoch mit NOS-Dysfunktion bei oxidativem Stress.

6.6. Oxidativer Stress und die Rolle von EDHF's in den vasodilatativen Postrezeptormechanismen

NO als Hauptvasodilatator wurde schon Ende der 1980er-Jahre beschrieben. Im Verlauf konnte aber ein anderer, NO-unabhängiger, vasodilatierender Faktor gezeigt werden. Dieser wirkt hyperpolarisierend auf die unterliegende glatte Muskulatur und wurde im Verlauf als endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (engl. Endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF) beschrieben [160]. Mit abnehmendem Gefäßdurchmesser nimmt die Bedeutung des EDHF für die Regulation des Gefäßtonus zu. Damit kommt EDHF vor allem in Widerstandsgefäßen eine wichtige Rolle zu [161]. An der A. ophthalmica erfolgte eine Beschreibung der Mechanismen der EDHF's bereits 2016 durch Manicam et al. [29]. Als EDHF's werden mehrere molekulare Mechanismen bezeichnet. Wichtige Mechanismen sind die Arachidonsäuremetaboliten der Cyclo-Oxygenase (COX), der Lipoxygenase (LOX) und des Cytochrom-P450-Weges (CYP-450). Andere, von Endothelzellen freigesetzte Autakoide sind z. B. H₂O₂, CO und H₂S. Am Auge wurden durch Manicam et al. bei der Untersuchung der EDHF-Mechanismen an der A. ophthalmica nach Blockade der LOX und CYP-450 eine fast vollständig aufgehobene Vasodilatation gezeigt. Es waren unter physiologischen Bedingungen nur teilweise CYP450-abhängige Produkte beteiligt, denn der Großteil der Vasodilatation war durch LOX-abhängige Produkte vermittelt. Daher wurden in dieser Studie nur die beiden hiervon abhängigen EDHF-Wege untersucht. In der Kontrollgruppe konnte eine Beteiligung von sowohl NO als auch EDHF an der Vasodilatation gezeigt werden. Bei den Postrezeptormechanismen der EDHF waren sowohl CYP-450 als auch LOX-abhängige Metaboliten beteiligt. Experimente mit gleichem Experimentaufbau wie die in dieser Arbeit verwendeten zeigten auch bei Gefäßen, die direkt nach dem Tod der C57BL/6J-Mäuse verwendet wurden, die gleichen Ergebnisse [29]. Von einem signifikanten Einfluss durch den Faktor der Inkubationszeit ist daher nicht auszugehen.

6.6.1. CYP-450

Eine Beteiligung von P-450-Monooxygenasen an der cholinergen Vasodilatation der A. ophthalmica als EDHF wurde beschrieben [29]. Die Produkte der P-450-Monooxygenasen sind EET's. Hyperpolarisierend wirken diese größtenteils über Aktivierung von Gap Junctions an der glatten Muskulatur [39]. Eine Beteiligung eines weiteren CYP-450 abhängigen Mechanismus z. B. einem EET-Rezeptor wurde auch diskutiert. Im Vergleich zu den LOX-

abhängigen Metaboliten des EDHF, kommt jedoch CYP-450 abhängigen Produkten, unter physiologischen Bedingungen, ein anteilmäßig geringerer Teil an der hier untersuchten M3-vermittelten ACh-abhängigen Vasodilatation zu [29]. Die Daten können hierbei sehr spezifisch verglichen werden, da die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Adrian Gericke diese Mechanismen mit beinahe identischem Experimentaufbau bereits erforscht hat [29]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Kontrollmedium bei Untersuchung des CYP-450-abhängigen Anteils der Vasodilatation eine reduzierte Vasodilatation, entsprechend den Daten von Manicam et al. [29]. CYP-450 abhängige Produkte verantworten demnach einen großen Teil der EDHF-vermittelten Vasodilatation. Unter Einfluss von oxidativem Stress war die Vasodilatation dagegen beinahe komplett erholt. Bei Zugabe des CYP-450-Blockers 17-ODYA zeigte sich die Vasodilatation beinahe komplett aufgehoben. Der Unterschied war hierbei hoch signifikant. Bei oxidativem Stress kommt demnach der CYP-450-abhängigen Vasodilatation die Hauptrolle bei der Vasodilatation zu. Man kann sogar bei oxidativem Stress von einer 'Kompensation der Vasodilatation durch die CYP-450-abhängigen Mechanismen' sprechen.

Einen weiteren Erklärungsansatz für veränderte vasoregulatorische Mechanismen bei oxidativem Stress zeigten Mentek et al. [30]. In Ihrer Arbeit wurde in einem Modell für Schlafapnoe an der Ratte Effekte auf die Vasoregulation der A. ophthalmica untersucht. Schlafapnoe zeichnet sich durch intermittierende Hypoxiephasen aus, die vermehrten oxidativen Stress in der Gefäßwand verursachen. In dieser Arbeit wurde auch die Hauptrolle der CYP-450 abhängigen vasodilatativen Mechanismen bei oxidativem Stress bestätigt. Es wurde jedoch ein Ungleichgewicht der vasokonstriktiven und vasodilatativen CYP-450-Produkte durch Hypoxie postuliert. Auch benötigt CYP-450 Sauerstoff für die Synthese der EET's [162]. Im Falle von Hypoxie zeigte sich eine Verschiebung der EET's hin zu vasokonstriktiven EET's wie 20-HETE. Diese Beobachtung unterstützt das Konzept einer Beeinflussung der CYP450-abhängigen Produktion durch Hypoxie. Unspezifisch, aber diese Beobachtung stützend, konnte beim AT₁-Rezeptor-Blocker Telmisartan eine Blockade von EET-produzierenden Enzymen gezeigt werden. Daher wurde bereits eine mögliche Aktivierung von CYP-abhängigen Wegen durch Ang II diskutiert [163, 164]. Die Verschiebung des Schwerpunktes auf CYP-450-abhängigen Produkte an der Vasodilatation ist jedoch nicht durch die eNOS-Dysfunktion erklärbar. Denn in einer Studie mit eNOS-Knockout-Mäusen hatte sich ein Schwerpunkt auf die LOX-abhängigen Metaboliten gezeigt [42].

Die Versuche dieser Arbeit stützen die größere Rolle der CYP450-abhängigen Mechanismen der Vasodilatation bei oxidativem Stress. An der A. ophthalmica gab es zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente keine Daten. Jedoch bleiben viele Fragen offen. Weitergehende Forschung sollte um die Untersuchung des Gleichgewichts der vasodilatativ und vasokonstriktiv wirkenden EET's ergänzt werden.

6.6.2 LOX

Manicam et al. konnten unter physiologischen Bedingungen zeigen, dass LOX-abhängige Metaboliten einen größeren Anteil an der EDHF-abhängigen Vasodilatation der A. ophthalmica der Maus haben als CYP-450-abhängige Produkte [29]. Endprodukte des LOX-Weges sind HEETA und THETA, welchen eine Gap Junction-aktivierende und damit hyperpolarisierende Rolle zugeschrieben wird. Es besteht also eine starke Abhängigkeit zu durch Gap Junctions vermittelten vasodilatativ wirkenden Mechanismen. Unterstützend konnte bei Manicam et al. keine zusätzliche Minderung der Vasodilatation durch kombinierte Blockade von LOX-Produkten und Gap Junctions erreicht werden [29]. Man geht bei der LOX-abhängigen Vasodilatation von einer autokrinen Wirkung mit Aktivierung von Kalzium-Kanälen aus [29].

Bei den Experimenten dieser Arbeit bestätigte sich die Relevanz des LOX-abhängigen Weges der Vasodilatation unter physiologischen Bedingungen. In der mit Ang II-inkubierten Gruppe zeigte sich jedoch keine signifikante Beteiligung von LOX an der Vasodilatation. Im Versuchsarm der mit Ang II-inkubierten Gefäße war die Vasodilatation zwar nach Blockade der LOX-abhängigen Produkte gering reduziert, jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Den LOX-abhängigen Produkten kommt im Falle oxidativen Stresses und endothelialer Dysfunktion demnach keine signifikante Rolle in der cholinergen Vasodilatation der A. ophthalmica zu.

6.7. Relevanz und Einordnung der Ergebnisse in bisherige Forschungsergebnisse

Die Mechanismen der endothelvermittelten murinen Vasodilatation in der A. ophthalmica wurden durch Manicam et al. 2016 erstmals ausführlich beschrieben [29]. Im Vergleich zu anderen Gefäßbetten zeigte sich dabei jedoch keine Beteiligung von Prostaglandinen. Bei der Vasodilatation an der murinen A. ophthalmica steht EDHF im Vordergrund. Hierbei sind LOX- und CYP450-abhängige Arachidonsäuremetaboliten beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen zeigte sich der Großteil der Vasodilatation durch LOX-abhängige Produkte vermittelt. Weitere unbekannte, möglicherweise kompensierende vasodilatatorische Mechanismen konnten in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da sich unter Blockade des NO- und EDHF-Weges keine verbleibenden vasodilatativen Mechanismen an der A. ophthalmica der Maus zeigten. Die von Manicam et al. erfassten Ergebnisse wurden durch die vorliegende Arbeit bestätigt. Erstmals konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch Ang II-vermittelten oxidativen Stress *in vitro* eine endotheliale Dysfunktion an der murinen A. ophthalmica erzeugt werden kann. Im Vergleich zu Studien *in vivo* in anderen Gefäßbetten war die endotheliale Dysfunktion nur in hohen Dosen von Ang II nachweisbar. Die in den

Experimenten dieser Arbeit benötigte Dosis war hoch und der Effekt am Gefäß mild ausgeprägt. Es ist nicht klar, inwieweit pathophysiologisch relevante Konzentrationen von Ang II im Blut erreicht werden und wie hoch diese sein müssen. Bei den, in dieser Arbeit genutzten, C57BL/6-Mäusen beträgt die physiologische Konzentration von Ang II im Plasma ~ 130 fmol/ml $= 130 \cdot 10^{-15}$ mol/l. Im Vergleich zu den hier verwendeten Konzentrationen ist dies viel geringer. Es zeigte sich auch zu vergleichbaren Experimenten an der A. Carotis der Maus [148], dass in dieser Arbeit eine recht hohe Konzentration von 10^{-7} mol/l notwendig war, um eine endotheliale Dysfunktion zu erzeugen. Bei den Arbeiten von Didion et al. war eine endotheliale Dysfunktion bereits bei 10^{-9} mol/l nachweisbar. Bei Ihnen handelte es sich aber um ein in vivo-Modell mit systemischer Applikation von Ang II über 7 Tage durch eine osmotische Pumpe. Es konnten systemische Effekte von Ang II, wie ein erhöhter Blutdruck gezeigt werden. Die lokalen Effekte in der Gefäßwand können bei systemischer Applikation jedoch nur eingeschränkt untersucht werden. Auch wurde neben dem systemisch zirkulierenden RAAS das Vorhandensein eines RAAS im lokalen Gewebe [56], unter anderem auch am Auge nachgewiesen [61]. Ang II-Spiegel wurden in verschiedenen Geweben des Auges um das 5-100-fache höher als im Blut gemessen [64]. Eine Aktivierung des lokalen RAAS an der A. ophthalmica wird z. B. der Hyperglykämie zugeschrieben [165]. Durch Ang II werden an der Netzhaut mittels Ang II-Rezeptoren auch die Produktion von ROS gesteigert und proinflammatorische Wege (z. B. AT_1R / $NF-\kappa B$) aktiviert [166]. Bei diabetischer Retinopathie wird ein Zusammenhang von Ang II und VEGF mit nachfolgend vermehrter Gefäßpermeabilität an den Netzhautgefäßen diskutiert [151]. Studien an retrobulbären Gefäßen mit Schwerpunkt auf das RAAS sind bisher jedoch nicht erfolgt, da die meisten Studien hierzu das intraokulare RAAS untersuchen, dass keine Assoziation zum systemischen RAAS hat. In den Experimenten dieser Arbeit konnten Effekte nur in vitro untersucht werden. Ein potenzieller Zusammenhang einer hohen Konzentration von Ang II durch lokales RAAS des umgebenden Gewebes kann erst durch Experimente in vivo untersucht werden. Auch die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Ang II-vermitteltem oxidativem Gefäßstress und einwandernden Immunzellen [66, 145] wurden durch die in vitro-Charakteristik in der vorliegenden Arbeit ausgeklammert. Pathophysiologisch handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Zusammenspiel von mehreren Faktoren, die nur in vivo vollständig erfasst werden können. Allerdings ist in vivo die Differenzierung der einzelnen Effekte in einem einzigen Experiment beinahe unmöglich. Auch sind Effekte durch Ang II in nachfolgenden Gefäßbetten, vor allem den retinalen Gefäßen, von der Wirkung an der A. ophthalmica selbst zu unterscheiden. Für retinale Gefäße sind Effekte durch oxidativen Stress vor allem im Rahmen der diabetischen Retinopathie und der Genese von Neovaskularisationen sehr intensiv erforscht worden. Aufgrund der schlechteren Zugänglichkeit der A. ophthalmica sind hier bedeutend weniger Daten vorhanden. Nichtsdestotrotz ist die pathophysiologische Relevanz

der verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Effekte hoch. Ergänzend muss weiter untersucht werden welche Mechanismen in den unterschiedlichen Gefäßbetten im Vordergrund stehen und vor allem wie in vivo und in vitro nachgewiesene Mechanismen sich gegenseitig beeinflussen oder ergänzen können. An der Aorta der Ratte konnte die nahezu vollständige Vermittlung der cholinergen Vasodilatation durch eNOS gezeigt werden[167]. Es bestehen auch in verschiedenen Bereichen der murinen Aorta unterschiedliche vasodilatative Kapazitäten[168]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit genauer Untersuchungen und eindeutiger Argumentation. Ein alleiniger Vergleich der Konzentration von Ang II bei verschiedenen Experimenten reicht nicht aus. Daher wählte diese Arbeit den spezifischen Weg der Untersuchung in vitro, um Aussagen nur über das Gefäßbett der murinen A. ophthalmica treffen zu können. Auch um der Verteilung der verschiedenen vasodilatativen Postrezeptormechanismen in verschiedenen Gefäßbetten gerecht zu werden, muss jedes Gefäßbett für sich allein untersucht werden.

7. Zusammenfassung

7.1. Methode im Vergleich zu anderen Methoden

7.1.1. Vorteile

Der größte Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode ist die Testung der durch oxidativen Stress erzeugten endothelialen Dysfunktion, unabhängig von der hypertensiven Wirkung von Ang II im Zusammenhang des systemischen RAAS-Systems. Andere Experimente konnten eine reduzierte endotheliale Dysfunktion im Zusammenhang mit einer künstlich erzeugten Hypertension an der A. ophthalmica bereits nachweisen [169]. Die beschriebene Methode ermöglicht eine direkte Messung der lokalen endothelvermittelten Gefäßregulation unter Einwirkung von oxidativem Stress. Selbst Postrezeptormechanismen können mit der verwendeten Methode unabhängig untersucht werden. Bisherige Methoden konnten die retrobulbären Gefäßaktivitäten klinisch nur mit Hilfe der Doppler-Sonografie untersuchen. Die retinalen Gefäße dagegen lassen sich durch die vorteilhafte anatomische Lage recht leicht mit Hilfe der Flickerlicht-Methode [170] oder einer OCT-Untersuchung beobachten [171]. Andere Methoden, die in vitro die Gefäßaktivität untersuchen, werden meist an der A. carotis oder der Aorta [11, 58, 70] durchgeführt. Gefäßringe werden hierbei mit einem Spannungsmesser verbunden, um Spannungskurven zu dokumentieren [58, 137]. Manche Kollegen nutzen aber auch, die in dieser Arbeit verwendete Methode der, funktionellen Experimente. Hierbei werden dann meist größere und leicht zugängliche Gefäße wie die A. carotis oder die A. basilaris [45] untersucht. Wahrscheinlich hat sich die in dieser Arbeit genutzte Methode aufgrund des nötigen handwerklichen Geschickes und des Aufwandes, um die Präparation durchzuführen, nicht durchsetzen können. Eine Übertragung von an der A. carotis erfassten Daten auf die A. ophthalmica ist nicht möglich. Weiter wurden unterschiedliche Versuchstiere verwendet. Die Bandbreite reicht vom Schwein [154] über das Kaninchen [11] und die Ratte [30] bis hin zur Maus [32]. Dies stellt die Notwendigkeit der Definition eines Modells für die vergleichbare Untersuchung der Vasoregulation der A. ophthalmica dar. Die endothelabhängigen vasodilatativen Mechanismen unter physiologischen Bedingungen wurden an der A. ophthalmica bereits durch Manicam et al. [29] beschrieben. In unseren Versuchen zeigten sich nach Inkubation im Kontrollmedium über Nacht keine Veränderung der Postrezeptormechanismen im Vergleich zu der Arbeit von Manicam. Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Modell für die Untersuchung der endothelabhängigen Vasoregulation der A. ophthalmica bei Einwirkung von oxidativem Stress demonstriert werden. Somit kann bei zukünftigen Arbeiten ein standardisiertes Modell genutzt

werden, um sehr spezifisch z. B. die vasodilatativen Mechanismen der CYP-450 abhängigen Produkte und das Zusammenspiel mit vasokonstriktiven Mechanismen weiter zu untersuchen.

7.1.2. Nachteile

Manche der Vorteile können auch als Nachteile gesehen werden, da die Methode zeitlich und handwerklich sehr aufwendig ist. Die Gefäßpräparation erlaubt kein großes Zeitfenster bis zur Durchführung der Experimente oder dem Beginn der Inkubation im Brutschrank. Während der Präparation wurden die Gefäße in kalter Krebs-Lösung gelagert. Bis zum Beginn der Experimente oder der Inkubation dürfen maximal 5-6 Stunden vergehen, um eine gute Gefäßaktivität zu erhalten. Gerade für Anfänger stellt dies bei zwei zu präparierenden Augen eine große zeitliche Herausforderung dar. Um konstante Ergebnisse und eine gute Darstellung in der Videomikroskopie zu erreichen, müssen die Gefäße vom umgebenden Bindegewebe freipräpariert werden. Eine zu manipulative Präparation kann zu Verletzung des Endothels führen und damit das Gefäß unbrauchbar machen. Dies ist jedoch erst unter der Mikroskopkamera bei Durchführung der funktionellen Experimente sichtbar. Es erfordert also auch viel praktische Erfahrung, um konstant gute Ergebnisse zu erreichen. Die Aussage der Experimente kann des Weiteren auch nur auf die endothelabhängige Funktion der Gefäße bezogen werden. Effekte durch das umgebende Bindegewebe und hieraus freigesetzte vasoaktive Faktoren können so nicht untersucht werden. Sinnvoll sind auch die Durchführung von Färbemethoden und PCR-Untersuchungen, wie in dieser Arbeit erfolgt, um die gezeigten Ergebnisse zu ergänzen. Die funktionellen Experimente können keine Aussage über die Hochregulation einzelner Enzyme oder Veränderungen auf Proteinebene geben. Dies ist per se kein Nachteil, aber eine Einschränkung der Aussagekraft, bei alleiniger Durchführung von funktionellen Experimenten.

7.2. Ausblick auf Pharmakologische Therapie- und Interaktionsmöglichkeiten sowie bisherige Therapieversuche am Auge

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente fanden an der A. ophthalmica der Maus statt. Eine direkte Übertragung zu der humanen A. ophthalmica kann nicht stattfinden, da dort die cholinerge Vasodilatation hauptsächlich über NO vermittelt wird [157]. Bei in vitro-Modellen konnte an der A. ophthalmica der Maus die endothelabhängige Vasodilatation ausgehend vom muskarinischen ACh-Rezeptor M_3 gezeigt werden, welche durch die NO- und EDHF-abhängige Vasodilatation wirken [29]. Das Gros der Gefäßstudien wurde an der A. carotis interna und nicht an der A. ophthalmica durchgeführt. Die A. ophthalmica ist zwar ein Abkömmling der A. carotis interna, hat jedoch eine andere regulatorische Funktion. Die A.

ophthalmica zählt aufgrund der Größe zu den Widerstandsgefäßen mit endothelabhängiger Tonusregulation, welche in dieser Arbeit untersucht wurde. Um pharmakologische und therapeutische Optionen für Pathologien der Vasoregulation zu entwickeln, müssen weitere Forschungsarbeiten mit Tiermodellen zu spezifischen Krankheitsmodellen erfolgen. Auch muss hierfür eine genaue Differenzierung der lokalen Wirkung an der A. ophthalmica und der intraokularen Wirkung erfolgen. Intraokulare Effekte und Therapieoptionen sind bisher deutlich mehr erforscht.

Teile des RAAS wurden in beinahe allen Anteilen des Auges nachgewiesen, jedoch kann Ang II nicht aus dem Plasma ins Auge diffundieren. Man geht von einer Ang II-Produktion im retinalen Pigmentepithel in Abhängigkeit vom systemischen RAAS aus [172]. Es konnte eine deutlich höhere Ang I und Ang II-Konzentration intraokular im Vergleich zur Plasma-Konzentration gezeigt werden [173]. Bereits 1981 konnte eine innerhalb weniger Minuten entstehende, durch Ang II-vermittelte, Leckage der Blut-Hirn-Schranke beschrieben werden [174]. In einem Modell, das Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems nachzubilden versucht, zeigte sich eine Verstärkung der para- und transzellulären Permeabilität im zerebralen Endothel durch Ang II [175]. Dieser Effekt wurde durch AT₁-Rezeptoren vermittelt und zeigte aber auch eine Veränderung der Expression auf Ebene der tight junctions [175]. Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke oder der Blut-Retina-Schranke am Auge werden für viele pathophysiologischen Veränderungen verantwortlich gemacht [46]. Ein Faktor, der auch zu einer reduzierten endothelvermittelten Vasodilatation führen könnte, ist die durch Ang II-vermittelte Apoptose der Endothelzellen und Konstriktion der Perizyten sowie der daraus resultierende verringerte Durchmesser der Arteriolen und Kapillaren [172]. Dadurch wird verständlich, dass das RAAS auch bei der Genese diverser intraokularer Erkrankungen wie diabetische Retinopathie, altersabhängige Makuladegeneration, Frühgeborenenretinopathie und Glaukom nachgewiesen wurde. Im Tiermodell konnte das RAAS auch zur Pathogenese der Uveitis und zur Katarakt assoziiert werden [61].

Auch bei diabetischer Retinopathie sind multiple Faktoren des RAAS-Systems beteiligt. Unter anderem wurde eine Vermittlung durch Ang II/ AT₁R gezeigt. Auf Veränderungen bei retinalem Sauerstoffmangel wie bei diabetischer Retinopathie kann das RAAS parakrin Einfluss über die entzündliche Wirkung von Angiotensin nehmen: Dies beinhaltet die Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand und das Gewebe-Remodeling [151]. Letzteres wird u. a. durch VEGF verursacht. Die entzündliche Aktivität wird durch die vermehrte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren (z. B. NF-κB) vermittelt [172]. Für Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren (ACEI) konnte dementsprechend in vorklinischen Studien ein

protektiver Effekt auf die Entwicklung einer diabetischen Retinopathie gezeigt werden. Für ACEI wurde außer bei Sicherheitsstudien am Tiermodell bisher noch kein Erfolg erzielt [176]. In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2002 mit systemischer Gabe von Enalapril in niedriger Dosierung, konnte bei intraokular normotensiven Typ-2-Diabetikern kein protektiver Effekt auf die Progression einer diabetischen Retinopathie gezeigt werden [177]. Protektive Effekte auf durch Diabetes induzierten oxidativen Stress und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wurde auch für AT₁-Rezeptor-Blocker beschrieben. In der DIRECT-Studie konnte jedoch kein protektiver Effekt für die systemische Gabe von Candesartan auf die Entwicklung der diabetischen Retinopathie in Typ-I-Diabetikern nachgewiesen werden [178]. Es werden bei diabetischer Retinopathie aber multiple Mechanismen diskutiert. Da die RAAS-Komponenten in allen Geweben im Auge vorliegen und einen entzündlichen Status bewirken, wurde auch ein protektiver Effekt auf die Entwicklung einer AMD vermutet. Beispielsweise hemmen AT₁-Rezeptor-Blocker und ACE-Inhibitoren die Progression einer choroidalen Neovaskularisation (CNV), das Kennzeichen einer feuchten AMD [179]. Auf das Glaukom hat das RAAS einen möglichen Einfluss, da sich bei Versuch der Blockade des Ang II-Signalweg positive Effekte auf die Senkung des Augeninnendruckes gefunden haben [61]. Allerdings handelt es sich bei diesen Effekten um Wirkungen im Auge selbst. Ang II wird z. B. auch die Hauptrolle der Vermittlung der Degeneration des Sehnerven zugeschrieben [172]. Sowohl die Kammerwasserproduktion durch den Ziliarkörper als auch der Abfluss durch das Trabekelmaschenwerk wird durch RAAS beeinflusst. Die systemische Gabe des ACE-Hemmer Captopril zeigte eine signifikante Augeninnendruck-Senkung durch einen erhöhten Kammerwasserabfluss. Dieser Effekt zeigte sich auch bei Losartan in einer Dosierung, die keine Blutdrucksenkung bewirkte. Auch wurde hier ein neuroprotektiver Effekt auf die retinalen Ganglienzellen unabhängig von der Augeninnendrucksenkenden Wirkung beschrieben [61]. Entsprechend zum bereits oben diskutierten Zusammenhang des Darmmikrobioms und der Beeinflussung des Immunsystems wird eine Beeinflussung auf die Entwicklung von diabetischer Retinopathie, altersabhängiger Makuladegeneration, choroidale Neovaskularisation und Uveitis diskutiert. Man spricht bereits von der Darm-Augen-Achse [180].

7.3. Mögliche Ergänzungen? Aus Ergebnissen resultierende Fragestellungen

Es zeigte sich in unseren Experimenten eine Ang II-vermittelte endotheliale Dysfunktion. Jedoch zeigte sich im Vergleich zu Didion et al. eine deutlich geringere Reduktion der Vasodilatation im Vergleich zu Gefäßexperimenten an der Aorta und der A. carotis [70, 137]. Erwähnen muss man jedoch auch die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen Gefäßbetten. Die A. ophthalmica gehört zu den Widerstandsgefäßen, bei denen die

endothelvermittelte Tonusregulation im Vordergrund steht. Sinnvoll sind sicher Experimente in vivo. Wobei jedoch ein reproduzierbares Modell für oxidativen Stress an der A. ophthalmica aufgrund der anatomischen Lage in vivo nur schwer umsetzbar ist. In diesem Fall könnten jedoch auch proliferative und inflammatorische Wirkungen durch oxidativen Stress untersucht werden. Weiter aufgeschlüsselt könnten z. B. einzelne Wirkungen der CYP-450-abhängigen Stoffwechselprodukte neue Forschungsansätze ergeben. Manicam et al. zeigten im Jahr 2017 bei eNOS^{-/-}-Mäusen Hinweise auf die Beteiligung von K_{ir}-Kanälen an der LOX-abhängigen Vasodilatation [42]. Auch wurde eine Beteiligung von K_v1.6-Kanälen an der endothelabhängigen Vasodilatation nachgewiesen [29]. Die genaue Erforschung der EDHF-abhängigen Mechanismen eröffnen demnach noch weitere Perspektiven.

Diese Arbeit klammert in der Diskussion auch aus Platzgründen etwas den Einfluss von Ang II auf die Vasokonstriktion der A. ophthalmica aus. Dies erfolgte auch da die Vasokonstriktion bei Untersuchung des endothelabhängigen Vasokonstriktors U46619 keine signifikante Veränderung bei Inkubation mit Angiotensin (Vgl. Abb. 5A) zeigte. Die Vasoregulation ist jedoch ein Gegenspiel von vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren. Mentek et al. postulierten 2018 anhand eines Modells für oxidativen Stress durch intermittierende Hypoxie ein Ungleichgewicht der vasokonstriktiven und vasodilatativen Produkte. Bei intermittierender Hypoxie konnte sowohl die Entwicklung vermehrten oxidativen Stresses gezeigt, als auch Hyperoxide direkt nachgewiesen werden [30]. Auch konnte bei intermittierender Hypoxie eine reduzierte endothelabhängige Antwort gezeigt werden [8]. Bei Mentek et al. zeigte sich eine deutlich erhöhte vasokonstriktive Antwort auf Endothelin-1. Endothelin-1 konnte bereits früher als der potenteste Vasokonstriktor an der A. ophthalmica der Ratte gezeigt werden [181]. Bei der erhöhten Sensitivität auf Endothelin-1 handelt es sich nicht um eine einmalig beschriebene Beobachtung. Der Effekt wurde vorher in Lungen- und Mesenterialgefäßen beschrieben [182, 183]. Über den Endothelinrezeptor Typ B (ET_RB) wird eine NO-vermittelte vasodilatative Wirkung erzeugt. Diese könnte durch oxidativen Stress und damit die verminderte Verfügbarkeit von NO auch vermindert sein [30]. Daher sollte, um ein klares Bild der Vasoregulation zu erhalten, die über Endothelin-1 vermittelten Mechanismen untersucht werden. Auch eine Veränderung auf Genebene ist vorstellbar und ergänzend zu untersuchen, da bei intermittierender Hypoxie eine Veränderung von Endothelinrezeptoren und NOS am Sehnervenkopf gezeigt werden konnte [30].

Ein weiterer, noch zu untersuchender, Einflussfaktor ist die Vasokonstriktion durch Ang II selbst. Über COX- und O₂⁻-abhängige Mechanismen kann Ang eine Angiotensin-Rezeptor-vermittelte Vasokonstriktion am zerebralen Endothel verursachen. Weiter wird die Ang II-vermittelte Konstriktion in Zerebralarterien auch durch H₂O₂ vermittelt und kann damit durch ROS-Produkte verursacht werden [141]. Eine weitere Möglichkeit zur ergänzenden

Untersuchung sind geschlechtsabhängige Unterschiede. Durch Ang II-induzierte Veränderungen wie z. B. ein Hyperoxidanstieg konnten in Östrogen-Rezeptor-Knockout-Mäusen erhöht nachgewiesen werden [184]. Eine akute Applikation von Ang II konnte bei männlichen Mäusen deutlich höhere Spiegel an ROS zeigen als bei weiblichen Mäusen [54]. Demnach könnte es einen protektiven Effekt von Östrogen geben. Die vasokonstriktive Antwort auf Ang II in zerebralen Arterien zeigte bei männlichen Mäusen eine verstärkte Kontraktion im Vergleich zu weiblichen Mäusen. Dies war von der Vermittlung von H₂O₂ und der Expression von NOX2 abhängig [185].

Abschließend sollte bedacht werden, dass beinahe alle hier betrachteten Erkrankungen eine Korrelation mit zunehmendem Alter haben. Bereits 1993 wurden histologisch degenerative Veränderungen an der A. ophthalmica beschrieben. Erklärbar ist dies durch vermindert ausgeprägte antioxidative Effekte und Reparaturmechanismen, welche so für einen verstärkten entzündlichen Stoffwechselzustand sorgen [9]. Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden nur an jungen und männlichen Tieren durchgeführt. Beispielsweise konnte an Zerebralarterien bei alten Mäusen, im Vergleich zu jungen Mäusen, eine durch ROS vermittelte endotheliale Dysfunktion gezeigt werden. Oxidativer Stress wurde dabei durch Ang II und AT₁-Rezeptoren vermittelt [45]. Eine spezifische Untersuchung mit verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen könnte weitere Aspekte aufzeigen.

7.4. Abschluss

In dieser Arbeit konnte in vitro an der murinen A. ophthalmica durch Ang II-vermittelter oxidativer Stress bestätigt werden. Dieser konnte durch Färbemethoden und funktionelle Experimente nachgewiesen werden. Es entsteht dadurch an den Gefäßen eine endotheliale Dysfunktion. Verursacht wird dies durch ROS und durch die AT₁-Rezeptor-NOX2-Achse vermittelt. Neben der eNOS zeigte sich bei oxidativem Stress auch die Lipoxxygenase dysfunktional. Bei oxidativem Stress zeigte sich die cholinerge Vasodilatation allein über den CYP-450-abhängigen Weg und dessen Endprodukte, die EET's, vermittelt. Dies eröffnet neue Perspektiven auf die weitere Erforschung der Vasoregulation der A. ophthalmica bei oxidativem Stress. Pathophysiologisch relevante Verbindungen zu oxidativem Stress können von der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration über die diabetische Retinopathie bis hin zum Glaukom gezogen werden. Der alle Lebewesen betreffende gemeinsame Nenner ist das zunehmende Vorkommen von oxidativem Stress im Alterungsprozess. Dies veranschaulicht die Relevanz weiterer Forschung der durch oxidativen Stress vermittelten Mechanismen auf die Gefäßregulation.

8. Anhang

8.1. Danksagung

Ich danke für das kritische Korrekturlesen durch meine Frau und Familie sowie die motivierende Unterstützung über die lange Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt und für Ihre Prägung durch Ihre Präsenz in Klinik sowie Leidenschaft für Forschung und wissenschaftliches Arbeiten. Nicht zuletzt jedoch auch dem Vorbild von und dem Kollegium der Augenklinik Tübingen.

8.2. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Michael Birk
Geburtsdatum und -ort:	18. November 1990 in Reutlingen
Staatsangehörigkeit:	deutsch

8.3. Erklärung zur Eigenständigen Verfassung

Hiermit erkläre ich die selbstständige Verfassung dieser Arbeit.

Die funktionellen Experimente wurden von mir mit Unterstützung durch durchgeführt. Ich danke für die Unterstützung beim Erlernen der Methode der DHE-Färbung sowie für die Unterstützung an den Färbemethoden und der Auswertung. Ich danke für die Durchführung der PCR an unseren eingesandten Proben. Ich danke für die Unterstützung an der Durchführung der Statistik und Datenauswertung.

Tübingen, Juni 2023

Michael Birk

9. Literaturverzeichnis

1. Bourne, R.R.A., et al., *Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Glob Health, 2017. **5**(9): p. e888-e897.
2. Flaxman, S.R., et al., *Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Glob Health, 2017. **5**(12): p. e1221-e1234.
3. Dimitrova, G., et al., *Relation between retrobulbar circulation and progression of diabetic retinopathy*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(5): p. 622-5.
4. Emre, M., et al., *Ocular blood flow alteration in glaucoma is related to systemic vascular dysregulation*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(5): p. 662-6.
5. Findl, O., et al., *Assessment of optic disk blood flow in patients with open-angle glaucoma*. Am J Ophthalmol, 2000. **130**(5): p. 589-96.
6. Marjanovic, I., et al., *Retrobulbar hemodynamic parameters in open-angle and angle-closure glaucoma patients*. Eye (Lond), 2012. **26**(4): p. 523-8.
7. Konukoglu, D. and H. Uzun, *Endothelial Dysfunction and Hypertension*. Adv Exp Med Biol, 2017. **956**: p. 511-540.
8. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease*. Acta Physiol (Oxf), 2009. **196**(2): p. 193-222.
9. Donato, A.J., et al., *Cellular and molecular biology of aging endothelial cells*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 122-35.
10. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H985-1002.
11. Didion, S.P. and F.M. Faraci, *Angiotensin II produces superoxide-mediated impairment of endothelial function in cerebral arterioles*. Stroke, 2003. **34**(8): p. 2038-42.

12. Yamada, M., et al., *Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14096-101.
13. Gericke, A., et al., *Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1602-8.
14. Gericke, A., et al., *Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(10): p. 7479-84.
15. Laspas, P., et al., *Role of nitric oxide synthase isoforms for ophthalmic artery reactivity in mice*. Exp Eye Res, 2014. **127**: p. 1-8.
16. Skinner, H.B., *Velocity-diameter relationships of the microcirculation*. Med Inform (Lond), 1979. **4**(4): p. 243-56.
17. Pape Hans-Christian, K.A., Silbernagl Stefan, *Physiologie*. 8.Auflage ed. 2018: Thieme. 1024.
18. Forstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 923-39.
19. Vanderkooi, J.M., M. Erecinska, and I.A. Silver, *Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions*. Am J Physiol, 1991. **260**(6 Pt 1): p. C1131-50.
20. Pechauer, A.D., D. Huang, and Y. Jia, *Detecting Blood Flow Response to Stimulation of the Human Eye*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 121973.
21. JW, K., *The Ocular Circulation*. 2010, San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. .
22. McDougal, D.H. and P.D. Gamlin, *Autonomic control of the eye*. Compr Physiol, 2015. **5**(1): p. 439-73.
23. Bergua, A., et al., *Innervation pattern of the preocular human central retinal artery*. Exp Eye Res, 2013. **110**: p. 142-7.
24. Funk, R.H., *Blood supply of the retina*. Ophthalmic Res, 1997. **29**(5): p. 320-5.

25. Laties, A.M., *Central retinal artery innervation. Absence of adrenergic innervation to the intraocular branches.* Arch Ophthalmol, 1967. **77**(3): p. 405-9.
26. Tobalem, S., J.S. Schutz, and A. Chronopoulos, *Central retinal artery occlusion - rethinking retinal survival time.* BMC Ophthalmol, 2018. **18**(1): p. 101.
27. Lai, E.Y., et al., *Adenosine restores angiotensin II-induced contractions by receptor-independent enhancement of calcium sensitivity in renal arterioles.* Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1117-24.
28. Didion, S.P., D.A. Kinzenbaw, and F.M. Faraci, *Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction.* Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1147-53.
29. Manicam, C., et al., *The Gatekeepers in the Mouse Ophthalmic Artery: Endothelium-Dependent Mechanisms of Cholinergic Vasodilation.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 20322.
30. Mentek, M., et al., *Chronic Intermittent Hypoxia Alters Rat Ophthalmic Artery Reactivity Through Oxidative Stress, Endothelin and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Pathways.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018. **59**(12): p. 5256-5265.
31. Gericke, A., et al., *Functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in murine ophthalmic arteries.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(7): p. 4795-9.
32. Gericke, A., et al., *Cholinergic responses of ophthalmic arteries in M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(10): p. 4822-7.
33. Gericke, A., et al., *Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor subtype in murine ophthalmic arteries after endothelial removal.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(1): p. 625-31.
34. Li, H. and U. Forstermann, *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease.* Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 161-7.

35. Förstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
36. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
37. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
38. Taylor, S.G. and A.H. Weston, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium*. Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(8): p. 272-4.
39. Krummen, S., J.R. Falck, and E. Thorin, *Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB^{+/+} mice*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(2): p. 264-70.
40. Imig, J.D., *Eicosanoid blood vessel regulation in physiological and pathological states*. Clin Sci (Lond), 2020. **134**(20): p. 2707-2727.
41. Fan, F., et al., *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid contributes to the inhibition of K⁺ channel activity and vasoconstrictor response to angiotensin II in rat renal microvessels*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82482.
42. Manicam, C., et al., *Compensatory Vasodilator Mechanisms in the Ophthalmic Artery of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Knockout Mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 7111.
43. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 715-748.
44. Davies, K.J., *The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing*. Arch Biochem Biophys, 2016. **595**: p. 28-32.
45. Modrick, M.L., et al., *Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(6): p. H1914-9.
46. Ung, L., et al., *Oxidative stress and reactive oxygen species: a review of their role in ocular disease*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(24): p. 2865-2883.

47. Forstermann, U., N. Xia, and H. Li, *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2017. **120**(4): p. 713-735.
48. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. *Circulation*, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
49. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(6): p. 313-9.
50. Sacca, S.C., et al., *The Outflow Pathway: A Tissue With Morphological and Functional Unity*. *J Cell Physiol*, 2016. **231**(9): p. 1876-93.
51. Furchgott, R.F., et al., *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1984. **6 Suppl 2**: p. S336-43.
52. Sena, C.M., et al., *Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 1668.
53. Thomson, L., et al., *Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems*. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **319**(2): p. 491-7.
54. De Silva, T.M. and F.M. Faraci, *Effects of angiotensin II on the cerebral circulation: role of oxidative stress*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 484.
55. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes*. *J Diabetes*, 2017. **9**(5): p. 434-449.
56. Patel, S., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies*. *Biomed Pharmacother*, 2017. **94**: p. 317-325.
57. Wang, D., et al., *Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(11): p. 2783-9.
58. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*.

- The Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(8): p. 1916-1923.
59. Lee, M.A., et al., *Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease*. Circulation, 1993. **87**(5 Suppl): p. Iv7-13.
 60. Meyer, P., J. Flammer, and T.F. Lüscher, *Local action of the renin angiotensin system in the porcine ophthalmic circulation: effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor antagonists*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(3): p. 555-62.
 61. Holappa, M., H. Vapaatalo, and A. Vaajanen, *Many Faces of Renin-angiotensin System - Focus on Eye*. Open Ophthalmol J, 2017. **11**: p. 122-142.
 62. Raman, V.K., Y.A. Lee, and K. Lindpaintner, *The cardiac renin-angiotensin-aldosterone system and hypertensive cardiac hypertrophy*. Am J Cardiol, 1995. **76**(13): p. 18d-23d.
 63. Miller, A.A., et al., *NADPH oxidase activity and function are profoundly greater in cerebral versus systemic arteries*. Circ Res, 2005. **97**(10): p. 1055-62.
 64. Danser, A.H., et al., *Angiotensin levels in the eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. **35**(3): p. 1008-18.
 65. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 976-82.
 66. Wenzel, P., et al., *Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction*. Circulation, 2011. **124**(12): p. 1370-81.
 67. Girouard, H., et al., *Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(4): p. 826-32.
 68. Forrester, S.J., et al., *Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology*. Physiol Rev, 2018. **98**(3): p. 1627-1738.

69. Abiodun, O.A. and M.S. Ola, *Role of brain renin angiotensin system in neurodegeneration: An update*. Saudi J Biol Sci, 2020. **27**(3): p. 905-912.
70. Didion, S.P., et al., *Superoxide contributes to vascular dysfunction in mice that express human renin and angiotensinogen*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2002. **283**(4): p. H1569-H1576.
71. Krejcy, K., et al., *Characterization of angiotensin-II effects on cerebral and ocular circulation by noninvasive methods*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **43**(5): p. 501-8.
72. Steigerwalt, R.D., Jr., et al., *Ocular and orbital blood flow in patients with essential hypertension treated with trandolapril*. Retina, 1998. **18**(6): p. 539-45.
73. Dubey, R.K., J. Flammer, and T.F. Lüscher, *Angiotensin II and insulin induce growth of ciliary artery smooth muscle: effects of AT1/AT2 antagonists*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(11): p. 2067-75.
74. Wakisaka, M., et al., *Suppression of sodium-dependent glucose uptake by captopril improves high-glucose-induced morphological and functional changes of cultured bovine retinal pericytes*. Microvasc Res, 1999. **58**(3): p. 215-23.
75. Nadal, J.A., et al., *Angiotensin II and retinal pericytes migration*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(2): p. 382-5.
76. Otani, A., et al., *Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(5): p. 1192-9.
77. Yamagishi, S., et al., *Angiotensin II augments advanced glycation end product-induced pericyte apoptosis through RAGE overexpression*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4265-70.
78. Zhang, X., et al., *Retinal expression of vascular endothelial growth factor is mediated by angiotensin type 1 and type 2 receptors*. Hypertension, 2004. **43**(2): p. 276-81.

79. Rizkalla, B., et al., *Temporal renal expression of angiogenic growth factors and their receptors in experimental diabetes: role of the renin-angiotensin system*. J Hypertens, 2005. **23**(1): p. 153-64.
80. Funatsu, H., et al., *Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema and other retinal disorders*. Am J Ophthalmol, 2002. **133**(4): p. 537-43.
81. Larsen, M., et al., *Protective effect of captopril on the blood-retina barrier in normotensive insulin-dependent diabetic patients with nephropathy and background retinopathy*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1990. **228**(6): p. 505-9.
82. Gupta, D. and P.P. Chen, *Glaucoma*. Am Fam Physician, 2016. **93**(8): p. 668-74.
83. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. Br J Ophthalmol, 2006. **90**(3): p. 262-7.
84. Stowell, C., et al., *Biomechanical aspects of axonal damage in glaucoma: A brief review*. Exp Eye Res, 2017. **157**: p. 13-19.
85. Heijl, A., et al., *Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(10): p. 1268-79.
86. Alasil, T., et al., *Correlation of retinal nerve fiber layer thickness and visual fields in glaucoma: a broken stick model*. Am J Ophthalmol, 2014. **157**(5): p. 953-59.
87. Emam, W.A., et al., *Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to high-tension primary open-angle glaucoma in an Egyptian cohort*. Mol Vis, 2014. **20**: p. 804-11.
88. Flammer, J., et al., *The impact of ocular blood flow in glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 2002. **21**(4): p. 359-93.
89. Mudassar Imran Bukhari, S., et al., *Microvascular endothelial function and primary open angle glaucoma*. Ther Adv Ophthalmol, 2019. **11**: p. 2515841419868100.

90. Gericke, A., et al., *Elevated Intraocular Pressure Causes Abnormal Reactivity of Mouse Retinal Arterioles*. *Oxid Med Cell Longev*, 2019. **2019**: p. 9736047.
91. Trivli, A., et al., *Normal-tension glaucoma: Pathogenesis and genetics*. *Exp Ther Med*, 2019. **17**(1): p. 563-574.
92. Pournaras, C.J., et al., *Regulation of optic nerve head blood flow in normal tension glaucoma patients*. *Eur J Ophthalmol*, 2004. **14**(3): p. 226-35.
93. Furlanetto, R.L., et al., *Risk factors for optic disc hemorrhage in the low-pressure glaucoma treatment study*. *Am J Ophthalmol*, 2014. **157**(5): p. 945-52.
94. Moore, D., et al., *Dysfunctional regulation of ocular blood flow: A risk factor for glaucoma?* *Clin Ophthalmol*, 2008. **2**(4): p. 849-61.
95. Fan, N., et al., *Ocular Blood Flow and Normal Tension Glaucoma*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 308505.
96. Bowe, A., et al., *Circadian Variation in Arterial Blood Pressure and Glaucomatous Optic Neuropathy--A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Am J Hypertens*, 2015. **28**(9): p. 1077-82.
97. Sugiyama, T., et al., *Association of endothelin-1 with normal tension glaucoma: clinical and fundamental studies*. *Surv Ophthalmol*, 1995. **39 Suppl 1**: p. S49-56.
98. Buckley, C., et al., *Systemic vascular endothelial cell dysfunction in normal pressure glaucoma*. *Br J Ophthalmol*, 2002. **86**(2): p. 227-32.
99. Karakucuk, S., et al., *Ocular blood flow in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS)*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008. **246**(1): p. 129-34.
100. Prada, D., et al., *Autoregulation and neurovascular coupling in the optic nerve head*. *Surv Ophthalmol*, 2016. **61**(2): p. 164-86.
101. Mozaffarieh, M. and J. Flammer, *New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(1): p. 43-9.
102. Wareham, L.K. and D.J. Calkins, *The Neurovascular Unit in Glaucomatous Neurodegeneration*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 452.

103. Tezel, G., *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(5): p. 490-513.
104. Benoist d'Azy, C., et al., *Oxidative and Anti-Oxidative Stress Markers in Chronic Glaucoma: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0166915.
105. Liu, Q., et al., *Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4580-9.
106. Izzotti, A., A. Bagnis, and S.C. Sacca, *The role of oxidative stress in glaucoma*. Mutat Res, 2006. **612**(2): p. 105-14.
107. Gheorghe, A., L. Mahdi, and O. Musat, *AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION*. Rom J Ophthalmol, 2015. **59**(2): p. 74-7.
108. Al-Zamil, W.M. and S.A. Yassin, *Recent developments in age-related macular degeneration: a review*. Clin Interv Aging, 2017. **12**: p. 1313-1330.
109. Smith, W., et al., *Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents*. Ophthalmology, 2001. **108**(4): p. 697-704.
110. McCarty, C.A., et al., *Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(10): p. 1455-62.
111. Wang, J.J., et al., *Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains eye studies*. Ophthalmology, 2003. **110**(10): p. 1960-7.
112. Bhutto, I. and G. Luttu, *Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(4): p. 295-317.
113. Villegas, V.M., et al., *Current advances in the treatment of neovascular age-related macular degeneration*. Expert Opin Drug Deliv, 2017. **14**(2): p. 273-282.

114. Green, W.R., P.J. McDonnell, and J.H. Yeo, *Pathologic features of senile macular degeneration*. Ophthalmology, 1985. **92**(5): p. 615-27.
115. Biesemeier, A., et al., *Choriocapillaris breakdown precedes retinal degeneration in age-related macular degeneration*. Neurobiol Aging, 2014. **35**(11): p. 2562-2573.
116. Parmeggiani, F., et al., *Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 546786.
117. Parmeggiani, F., et al., *Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 435607.
118. Jarrett, S.G. and M.E. Boulton, *Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration*. Mol Aspects Med, 2012. **33**(4): p. 399-417.
119. Toma, C., et al., *Oxidative and Nitrosative Stress in Age-Related Macular Degeneration: A Review of Their Role in Different Stages of Disease*. Antioxidants (Basel), 2021. **10**(5).
120. Dimitrova, G., Y. Tamaki, and S. Kato, *Retrobulbar circulation in patients with age-related maculopathy*. Eye (Lond), 2002. **16**(5): p. 580-6.
121. Nowak, I., et al., *[Color Doppler imaging of the retrobulbar circulation in non-exudative and exudative age-related macular degeneration]*. Klin Oczna, 2005. **107**(1-3): p. 63-7.
122. Blasiak, J., et al., *The Aging Stress Response and Its Implication for AMD Pathogenesis*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(22).
123. Decanini, A., et al., *Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration*. Am J Ophthalmol, 2007. **143**(4): p. 607-15.
124. Leasher, J.L., et al., *Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010*. Diabetes Care, 2016. **39**(9): p. 1643-9.

125. Ding, J. and T.Y. Wong, *Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema*. *Curr Diab Rep*, 2012. **12**(4): p. 346-54.
126. Ponto, K.A., et al., *Prevalence of diabetic retinopathy in screening-detected diabetes mellitus: results from the Gutenberg Health Study (GHS)*. *Diabetologia*, 2016. **59**(9): p. 1913-9.
127. Pauk-Domanska, M. and D. Walasik-Szemplinska, *Color Doppler imaging of the retrobulbar vessels in diabetic retinopathy*. *J Ultrason*, 2014. **14**(56): p. 28-35.
128. Salvatore, S. and E.M. Vingolo, *Endothelin-1 role in human eye: a review*. *J Ophthalmol*, 2010. **2010**: p. 354645.
129. Shin, E.S., C.M. Sorenson, and N. Sheibani, *Diabetes and retinal vascular dysfunction*. *J Ophthalmic Vis Res*, 2014. **9**(3): p. 362-73.
130. Gardner, T.W. and J.R. Davila, *The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2017. **255**(1): p. 1-6.
131. Lazzara, F., et al., *Aflibercept regulates retinal inflammation elicited by high glucose via the PIGF/ERK pathway*. *Biochem Pharmacol*, 2019. **168**: p. 341-351.
132. Pang, B., et al., *Luo Tong formula attenuates retinal inflammation in diabetic rats via inhibition of the p38MAPK/NF- κ B pathway*. *Chin Med*, 2020. **15**: p. 5.
133. Wojtala, A., et al., *Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry*. *Methods Enzymol*, 2014. **542**: p. 243-62.
134. Gericke, A., et al., *Retinal arteriole reactivity in mice lacking the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene*. *Exp Eye Res*, 2019. **181**: p. 150-156.
135. Schröder, K., et al., *Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(9): p. 1353-60.
136. Dzau, V.J., *Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease*. *Hypertension*, 2001. **37**(4): p. 1047-1052.

137. Didion, S.P., et al., *Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 619-24.
138. Münzel, T., et al., *Detection of superoxide in vascular tissue*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1761-8.
139. Choudhary, R., et al., *Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders*. J Curr Ophthalmol, 2017. **29**(1): p. 7-16.
140. Kojda, G. and D. Harrison, *Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 562-71.
141. Miller, A.A., et al., *NADPH oxidase activity is higher in cerebral versus systemic arteries of four animal species: role of Nox2*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(1): p. H220-5.
142. Chrissobolis, S., et al., *Role of Nox isoforms in angiotensin II-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in brain*. J Appl Physiol (1985), 2012. **113**(2): p. 184-91.
143. Karbach, S.H., et al., *Gut Microbiota Promote Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction*. J Am Heart Assoc, 2016. **5**(9).
144. Wenzel, P., et al., *Redox regulation of cardiovascular inflammation - Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species*. Free Radic Biol Med, 2017. **109**: p. 48-60.
145. Molitor, M., et al., *Nox2+ myeloid cells drive vascular inflammation and endothelial dysfunction in heart failure after myocardial infarction via angiotensin II receptor type 1*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(1): p. 162-177.
146. Kröller-Schön, S., et al., *Endothelial α 1AMPK modulates angiotensin II-mediated vascular inflammation and dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2019. **114**(2): p. 8.
147. Haefliger, I.O., J. Flammer, and T.F. Lüscher, *Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human*

- ophthalmic artery*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(7): p. 2340-3.
148. Ryan, M.J., et al., *Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice*. Hypertension, 2004. **43**(5): p. 1074-9.
149. Ferrari-Dileo, G., E.B. Davis, and D.R. Anderson, *Angiotensin II binding receptors in retinal and optic nerve head blood vessels. An autoradiographic approach*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(1): p. 21-6.
150. Sato, T., et al., *Quantitative receptor autoradiographic analysis for angiotensin II receptors in bovine retinal microvessels: quantitation with radioluminography*. Cell Mol Neurobiol, 1993. **13**(3): p. 233-45.
151. Kim, J.H., et al., *Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(3): p. 621-8.
152. Moravski, C.J., et al., *Retinal neovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin system*. Hypertension, 2000. **36**(6): p. 1099-104.
153. Wenzel, P., et al., *Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus*. Atherosclerosis, 2008. **198**(1): p. 65-76.
154. Zadeh, J.K., et al., *Responses of retinal arterioles and ciliary arteries in pigs with acute respiratory distress syndrome (ARDS)*. Exp Eye Res, 2019. **184**: p. 152-161.
155. Loh, Y.C., et al., *Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(1).
156. Rubin, L.J., et al., *Prostacyclin-induced acute pulmonary vasodilation in primary pulmonary hypertension*. Circulation, 1982. **66**(2): p. 334-338.
157. Haefliger, I.O., J. Flammer, and T.F. Luscher, *Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **33**(7): p. 2340-3.

158. Neufeld, A.H., M.R. Hernandez, and M. Gonzalez, *Nitric oxide synthase in the human glaucomatous optic nerve head*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(4): p. 497-503.
159. Neufeld, A.H., A. Sawada, and B. Becker, *Inhibition of nitric-oxide synthase 2 by aminoguanidine provides neuroprotection of retinal ganglion cells in a rat model of chronic glaucoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9944-8.
160. Chen, G., H. Suzuki, and A.H. Weston, *Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1165-74.
161. Shimokawa, H., et al., *The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **28**(5): p. 703-11.
162. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circulation Research, 1994. **74**(6): p. 1141-1148.
163. Senda, A., et al., *Angiotensin II Receptor Blockers Inhibit the Generation of Epoxyeicosatrienoic Acid from Arachidonic Acid in Recombinant CYP2C9, CYP2J2 and Human Liver Microsomes*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017. **121**(4): p. 239-245.
164. Bellien, J., et al., *Multiple and Opposite Effects of Angiotensin II Receptor Blockers on the Bioavailability of Epoxyeicosatrienoic Acids*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017. **121**(4): p. 213-214.
165. Wilkinson-Berka, J.L., et al., *Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation*. Exp Eye Res, 2019. **187**: p. 107766.
166. Nagai, N., et al., *Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(9): p. 4342-50.

167. Capettini, L.S., S.F. Cortes, and V.S. Lemos, *Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta*. Eur J Pharmacol, 2010. **643**(2-3): p. 260-6.
168. Honda, H., et al., *A regional variation of acetylcholine-induced relaxation in different segments of rat aorta*. Physiol Behav, 1997. **63**(1): p. 55-8.
169. Tsai, S.H., et al., *Alterations of Ocular Hemodynamics Impair Ophthalmic Vascular and Neuroretinal Function*. Am J Pathol, 2018. **188**(3): p. 818-827.
170. Michelson, G., A. Patzelt, and J. Harazny, *Flickering light increases retinal blood flow*. Retina, 2002. **22**(3): p. 336-43.
171. Luo, X., et al., *Ocular Blood Flow Autoregulation Mechanisms and Methods*. J Ophthalmol, 2015. **2015**: p. 864871.
172. Marin Garcia, P.J. and M.E. Marin-Castaño, *Angiotensin II-related hypertension and eye diseases*. World J Cardiol, 2014. **6**(9): p. 968-84.
173. Igić, R., *Four decades of ocular renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems (1977-2017)*. Exp Eye Res, 2018. **166**: p. 74-83.
174. Grubb, R.L., Jr. and M.E. Raichle, *Intraventricular angiotensin II increases brain vascular permeability*. Brain Res, 1981. **210**(1-2): p. 426-30.
175. Guo, S., et al., *Effects of angiotensin-II on brain endothelial cell permeability via PPARalpha regulation of para- and trans-cellular pathways*. Brain Res, 2019. **1722**: p. 146353.
176. Nath, M., et al., *Ocular kinetics and safety of intravitreally injected angiotensin converting enzyme inhibitor lisinopril*. Int J Retina Vitreous, 2018. **4**: p. 42.
177. Pradhan, R., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition for the treatment of moderate to severe diabetic retinopathy in normotensive Type 2 diabetic patients. A pilot study*. J Diabetes Complications, 2002. **16**(6): p. 377-81.

178. Chaturvedi, N., et al., *Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials*. *Lancet*, 2008. **372**(9647): p. 1394-402.
179. Nagai, N., et al., *Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: minimal role of bradykinin*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. **48**(5): p. 2321-6.
180. Floyd, J.L. and M.B. Grant, *The Gut-Eye Axis: Lessons Learned from Murine Models*. *Ophthalmol Ther*, 2020. **9**(3): p. 499-513.
181. Jarajapu, Y.P., M.B. Grant, and H.J. Knot, *Myogenic tone and reactivity of the rat ophthalmic artery*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(1): p. 253-9.
182. Snow, J.B., et al., *Role for PKC β in enhanced endothelin-1-induced pulmonary vasoconstrictor reactivity following intermittent hypoxia*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011. **301**(5): p. L745-54.
183. Allahdadi, K.J., B.R. Walker, and N.L. Kanagy, *Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension*. *Hypertension*, 2005. **45**(4): p. 705-9.
184. Meyer, M.R., et al., *Obligatory role for GPER in cardiovascular aging and disease*. *Sci Signal*, 2016. **9**(452): p. ra105.
185. De Silva, T.M., et al., *Gender influences cerebral vascular responses to angiotensin II through Nox2-derived reactive oxygen species*. *Stroke*, 2009. **40**(4): p. 1091-7.