

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

**Der Einfluss von Betulinsäure auf den
Ischämie-Reperfusionsschaden in der Mausretina**

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

Vorgelegt von

Johanna Charlotte Unkrig
aus Bonn

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 08.12.2020

“There is a theory which states that if ever anyone discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable.”

– Douglas Adams

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	8
I. Einleitung	14
II. Literaturdiskussion	16
1. Epidemiologische Bedeutung retinaler Ischämie-Reperfusionsschäden ...	16
2. Pathomechanismen bei Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI)	17
2.1 Exzitotoxizität	17
2.2 Überladung der Zelle mit Calcium	18
2.3 Oxidativer Stress	20
2.3.1 Nitrosativer Stress	23
2.3.2 Oxidativer Stress und Pathomechanismen des IRI	23
2.4 Entzündungsreaktion (Neuroinflammation)	25
3. Wichtige Enzyme bei Ischämie-Reperfusionsschäden.....	27
3.1. Die Nicotinamidadenindinukleotidphosphatoxidasen (NADPH-Oxidasen) ...	27
3.1.1 Die NADPH-Oxidase 1 (NOX1)	28
3.1.2 Die NADPH-Oxidase 2 (NOX2)	28
3.1.3 Die NADPH-Oxidase 4 (NOX4)	29
3.2. Die Superoxiddismutasen	30
3.2.1 Die Superoxiddismutase 1 (SOD1)	31
3.2.2 Die Superoxiddismutase 2 (SOD2)	32
3.2.3 Die Superoxiddismutase 3 (SOD3)	33
3.3. Die Katalase, die Glutathionperoxidase 1 und die Hämoxygenase 1	34
3.3.1 Die Katalase (CAT)	34
3.3.2 Die Glutathionperoxidase 1 (GPX1)	36
3.3.3 Die Hämoxygenase 1 (HO1)	38
3.4. Die Stickstoffmonoxidsynthasen	40
3.4.1 Die neuronale NOS (nNOS)	41
3.4.2 Die induzierbare NOS (iNOS)	42
3.4.3 Die endotheliale NOS (eNOS)	43
4. Betulinsäure	44

III. Material und Methoden	47
1. Intervention: Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI)	50
1.1 Vorbereitende Maßnahmen	50
1.2 Darreichungsform und Dosierung von Betulinsäure und Placebo	50
1.3 Erzeugung der Ischämie	51
1.3.1 Narkose	51
1.3.2 Erhöhung des Intraokular drucks (IOP)	52
1.4 Abschließende Maßnahmen	54
1.5 Enukleation	54
2. Analytische Methoden	55
2.1 Gruppeneinteilung	55
2.2 Methoden zur Erfassung der Anzahl von Neuronen in der retinalen Ganglienzellschicht (GCL)	55
2.2.1 Herstellung von Flachpräparaten	55
2.2.2 Kresylblau-Färbung	56
2.2.3 Bildgewinnung und -analyse (Zellzählung)	57
2.3 Ermittlung der Axonanzahl im Nervus opticus	58
2.3.1 Anfertigung der Schnittpräparate und die Toluidinblau-Färbung	58
2.3.2 Ermittlung der Axonanzahl	59
2.4 Dihydroethidium-Färbung zur ROS-Bestimmung	60
2.4.1 Anfertigung der Schnittpräparate für die DHE - Färbung	60
2.4.2 Dihydroethidium-Färbung	61
2.4.3 Aufnahmen der DHE-gefärbten Schnittpräparate	62
2.4.4 Auswertungsverfahren der DHE-Präparate	62
2.5 Bestimmung der postinterventionellen Genexpression	63
2.5.1 Extraktion der mRNA	63
2.5.2 Gewinnung von cDNA	64
2.5.3 Das Prinzip der PCR	64
2.5.4 Hot-Start PCR	65
2.5.5 Verwendete Primersequenzen (forward – reverse)	66
2.5.6 Quantifizierung	66
3. Statistische Verfahren	67
IV. Ergebnisse	68
1. Veränderung des Gewichts	68

2. Beobachtung des Intraokularsdrucks (IOP)	69
Vorbemerkung zu den Ergebnissen	70
3. Anzahl der Neuronen in der Ganglienzellschicht (GCL) und Anzahl der retinalen Ganglienzellen (RGC).....	70
4. Der oxidative Stress beim retinalen IRI.....	73
5. Veränderungen der Genexpression beim retinalen IRI.....	73
5.1 Expression der NADPH-Oxidasen beim retinalen IRI	74
1. NOX1 beim retinalen IRI	74
2. NOX2 beim retinalen IRI	74
3. NOX4 beim retinalen IRI	75
5.2 Expression der Superoxiddismutasen beim retinalen IRI.....	75
1. SOD1 beim retinalen IRI	75
2. SOD2 beim retinalen IRI	76
3. SOD3 beim retinalen IRI	76
5.3 Expression der Katalase, Glutathionperoxidase 1, Hämoxigenase 1 beim IRI	77
1. CAT beim retinalen IRI.....	77
2. GPX1 beim retinalen IRI	77
3. HO1 beim retinalen IRI.....	78
5.4 Expression der NO-Synthasen beim retinalen IRI	79
V. Diskussion.....	80
1. Bekannte Auswirkungen der Betulinsäure beim (retinalen) IRI	80
2. Auswirkungen der Betulinsäure auf die Anzahl der Neurone in der	82
Ganglienzellschicht und auf die Anzahl retinaler Ganglienzellen beim retinalen IRI	82
3. Auswirkungen der Betulinsäure auf den oxidativen Stress beim retinalen IRI	83
4. Auswirkungen der Betulinsäure auf die Genexpression zentraler Enzyme	85
beim retinalen IRI	85
4.1 Die NADPH-Oxidasen (NOX)	85
4.1.1 NOX und ihre Wirkung beim retinalen IRI.....	86
4.1.2 NOX - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI.....	88

4.1.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die NOX - Expression beim (retinalen) IRI.....	91
4.2 Die Superoxiddismutasen (SOD)	95
4.2.1 SOD und ihre Wirkung beim retinalen IRI.....	96
4.2.2 SOD - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI.....	97
4.2.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die SOD - Expression beim (retinalen) IRI.....	99
4.3 Die Katalase, Glutathionperoxidase-1 und Hämoxxygenase.....	101
4.3.1 Die CAT, GPX1 sowie HO1 und ihre Wirkung beim retinalen IRI	101
4.3.2 CAT-, GPX1-, HO1-Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI.....	103
4.3.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die Expression der CAT, GPX1 und HO1	104
beim (retinalen) IRI	104
4.4 Die NO-Synthasen (NOS).....	107
4.4.1 NOS und ihre Wirkung beim retinalen IRI.....	107
4.4.2 NOS - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI.....	109
4.4.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die NOS - Expression beim (retinalen) IRI.....	111
5. Einschränkungen und Grenzen dieser experimentellen Untersuchung ...	112
VI. Zusammenfassung	114
VII. Literaturverzeichnis	116
Danksagung.....	151
Lebenslauf	152

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
•OH	Hydroxylradikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
2-OH-Ethidium	2-Hydroxyethidium
AC	Amakrinzelle(n), <i>engl. amacrine cell(s)</i>
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Varianzanalyse, <i>engl. analysis of variance</i>
AP-1	<i>engl. activator protein 1, Transkriptionsfaktor</i>
AP-2	<i>engl. activating protein 2, Transkriptionsfaktor</i>
ARE	<i>engl. Antioxidant response element</i>
ASIC	“Säure-sensitiver Ionenkanal”, <i>engl. acid sensing ion channel</i>
Atox1	<i>engl. Antioxidant 1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase MNK	Menkes ATPase, <i>auch: ATP7A</i>
BA	Betulinsäure, <i>engl. betulinic acid</i>
Bach1	BTB and CNC homolog 1, <i>Transkriptionsfaktor aus der CNC/bZIP-(“cap’n’collar basic leucine zipper”)-Familie mit BTB/POZ-(“broad complex, tramtrack, bric à brac/poxvirus and zincfinger”)-Domäne</i>
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BRIN-BD11	<i>Insulinproduzierende, glukosesensitive β-Zelllinie, ursprünglich aus Inselzellen des Pankreas (Ratte)</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein; Familie von Transkriptionsfaktoren; (CCAAT = Cytosin, Adenin und Thymin)</i>
C57 ^{<u>B</u>} _L /6J	<i>Mausinzuchtstamm mit schwarzer („<u>B</u>Lack“) Fellfarbe aus dem Jackson Laboratory, USA</i>
C57 ^{<u>B</u>} _L /6N	<i>Mausinzuchtstamm mit schwarzer („<u>B</u>Lack“) Fellfarbe aus dem National Institute of Health, USA</i>
Ca ²⁺	Calcium(kation)
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat

CAT	Katalase
CCD	<i>engl. charge-coupled device</i>
CCS	<i>Copper Chaperone for SOD1</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cGPX	zelluläre / zytosolische / klassische Glutathionperoxidase
cNOS	Konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase(n)
Cpd	<i>engl. Compound („Verbindung“), möglicher Zustand der Katalase</i>
CREB	<i>engl. cAMP-response element binding protein</i>
C _T	Schwellenwertzyklus, <i>engl. threshold cycle value</i>
Cu ²⁺ bzw. Cu ⁺	Kupferkation
CuZnSOD	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase(n)
Cyba	α-Untereinheit von Cytochrom b _{558/245}
Cybb	<i>β-Kette/schwere Kette des Cytochrom b₅₅₈</i>
CYP	Cytochrom P ₄₅₀
d	Tag (des Experiments), <i>engl. day</i>
Da	Dalton, 1 Da = 1u ≈ 1,66 x 10 ⁻²⁷ kg, <i>entspricht 1/12 des Gewichts des ¹²C-Atoms</i>
dAC	“verschobene” Amakrinzelle(n), <i>engl. displaced amacrine cell(s)</i>
DAMP	Alarmin, <i>engl. danger/damage-associated molecular pattern</i>
DHE	Dihydroethidium, <i>auch: Hydroethidin</i>
DIABLO	<i>Diablo IAP-(inhibitor of apoptosis)-binding mitochondrial protein</i> oder <i>direct IAP-binding protein with low PI</i>
DMSO	Dimethylschwefeloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>engl. desoxyribulnucleic acid</i>
DUOX	Duale Oxidasen
ECM	Extrazelluläre Matrix, <i>engl. extracellular matrix</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FAD	Flavinadenindinukleotid, <i>auch: Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
Fe ²⁺ bzw. Fe ³⁺	Eisenkation
Fe[]	Eisen, verschiedene Wertigkeiten
FeSOD	Eisen-Superoxiddismutase(n)
FMN	Flavinmononukleotid
G	Gauge, <i>Einheit des Außendurchmessers von Kanülen</i>

gp91-2	<i>auch: NOX1</i>
gp91phox	<i>auch: NOX2</i>
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBD	Heparin-bindende Domäne, <i>engl. heparin-binding domain</i>
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HP	Hochdruck, <i>engl. high pressure</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene, <i>engl. human umbilical vein endothelial cell(s)</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IOP	Intraokulardruck, <i>engl. intraocular pressure</i>
IPO-A, -B	Indophenoloxidase A bzw. B, <i>auch: Superoxiddismutase 1 bzw. 2</i>
IR-Ereignis	Ischämie-Reperfusionsergebnis
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden (-schäden/-schädigung), <i>engl. ischemia/reperfusion injury</i>
K ⁺	Kaliumkation(en)
kDa	Kilodalton, <i>siehe Dalton [Da]</i>
Keap1	<i>engl. Kelch-like ECH-associated protein</i>
KGW	Körpergewicht
KOX-1	Renale Oxidase, <i>auch: NOX4</i>
macNOS	Makrophagen-Stickstoffmonoxidsynthase
Met ^{ox()/red(e-)}	Metallion, oxidiertes/reduziertes Zustand
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, entspricht Torr; $1 \text{ Torr} = 101325 \text{ N} / 760 \text{ m}^2$
Mn ³⁺ bzw. Mn ²⁺	Mangankation
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MOX-1	Mitogene Oxidase, <i>auch: NOX1</i>

MPTP	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore, <i>engl. mitochondrial permeability transition pore</i>
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure (“Boten-RNA”), <i>engl. messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>engl. mechanistic (mammalian) target of Rapamycin</i> , Serin/Threonin-Kinase
n	Stichprobengröße
n(GT)	<i>n</i> -fache Wiederholung des Basenpaares Guanin-Thymin
Na ⁺	Natriumkation(en)
NADPH/NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphat
Ncf	Neutrophiler zytosolischer Faktor, <i>engl. neutrophilic cytosolic factor</i>
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NFE2L2	<i>engl. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NF-κB	<i>engl. nuclear factor kappa B (kappa light chain enhancer of activated B cells)</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid, <i>engl. nitric oxide</i>
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase(n), <i>engl. nitric oxide synthase</i>
NOX	Nicotinamidadenindinukleotiddiphosphatoxidase, NADPH-Oxidase
nox _a	<i>engl. NADPH oxidase activator</i>
nox _o	<i>engl. NADPH oxidase organizer</i>
NP	Normaldruck, <i>engl. normal pressure</i>
Nrf2	<i>auch: NFE2L2, Transkriptionsfaktor</i>
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Hyperoxid, auch Superoxid (veraltet)
OGD	Glukose- und Sauerstoffmangel, <i>engl. oxygen-glucose deprivation</i>
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p22phox	<i>auch: b558, Cyba</i>
p40phox	<i>auch: Ncf4</i>
p47phox	<i>auch: ncf1, noxo2</i>

p47phox	<i>auch: noxo2, Ncf1</i>
p53	Tumorprotein p53
p67phox	<i>auch: noxa2, ncf2</i>
p67phox	<i>auch: noxa2, Ncf2</i>
PBS	Phosphatgepufferte Lösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>engl. polymerase chain reaction</i>
pH	pondus/potentia Hydrogenii, $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+]$
phox	Phagozytenoxidasen
Por	Porphyrin
PPAR γ	<i>engl. peroxisome proliferator-activator receptor γ, Transkriptionsfaktor</i>
PRR	“Mustererkennungsrezeptoren”, <i>engl. pattern recognition receptor</i>
PU.1	<i>auch: Spi1; Transkriptionsfaktor mit purinreicher Bindungsstelle</i>
R213G	<i>Polymorphismus, bei dem an Position 213 im Peptid die ursprüngliche Aminosäure G (Glycin) durch die Aminosäure R (Arginin) ersetzt wird</i>
Rac1	<i>engl. ras-related C3 botulinium toxin substrate 1 (Rac family small GTPase 1)</i>
Ras	<i>Enzymsuperfamilie, initiale Forschung an <u>Ratten</u> mit <u>Sarkomentwicklung</u> (karzinogene Viren)</i>
RENOX	Renale Oxidase, <i>auch: NOX4</i>
RGC	Retinale Ganglienzelle(n), <i>engl. retinal ganglion cell(s)</i>
RNS	Reaktive Stickstoffverbindungen, <i>engl. reactive nitrogen species</i>
R-OOH	Hydroperoxide, <i>R als variabler Rest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen, <i>engl. reactive oxygen species</i>
RT-qPCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung, <i>engl. standard deviation</i>
Sec	Selenocystein
SEM	Standardfehler auf den Mittelwert, <i>engl. standard error of the mean</i>
sGC	Lösliche Guanylyzyklase, <i>engl. soluble guanylyl cyclase</i>
Smac (SMAC)	<i>engl. second mitochondria-derived activator of caspases, siehe auch DIABLO</i>
SOD	Superoxiddismutase

Sp1	<i>engl. specificity protein 1, Transkriptionsfaktor</i>
Spi1	<i>engl. spleen focus forming virus (SFFFV) proviral integration oncogene</i>
STAT	<i>engl. signal transducer and activator of transcription</i>
StRE	Stress-response element
TBP	<i>engl. TATA-(thymine-adenine-...)-binding protein</i>
TGA	<i>Basentriplett aus Thymin-Guanin-Adenin</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TRP	Transient receptor potential-Ionenkanal, <i>rezeptorgekoppelter Ionenkanal</i>
TRPV4	<i>engl. transient receptor potential vanilloid isoform 4</i>
tSOD-Aktivität	<i>Gesamtaktivität aller Superoxiddismutasen</i>
u	<i>Unified atomic mass, entspricht Dalton</i>
ucNOS	Entkoppelte Stickstoffmonoxidsynthase, <i>engl. uncoupled/uncoupling nitric oxide synthase</i>
UGA	<i>Basentriplett aus Uracil-Guanin-Adenin</i>
VEGF	<i>engl. vascular endothelial growth factor</i>
XO	Xanthinoxidase
Zn ²⁺	Zinkkation
λ (lambda)	Wellenlänge

I. Einleitung

Diese Dissertation untersucht die Auswirkungen der Betulinsäure auf den retinalen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI). Dabei werden insbesondere die Effekte auf den oxidativen Stress betrachtet, welcher einen (besonders) wichtigen Aspekt retinaler Ischämie-Reperfusionsschäden ausmacht (2).

Ischämische Schädigungen und oxidativer Stress treten bei verschiedenen ophthalmologischen Erkrankungen auf. Hierzu zählen Verschlüsse arterieller Gefäße, die diabetische Retinopathie und das Glaukom (3-5), aber auch die Frühgeborenenretinopathie (Retinopathia praematurorum) (6). Diese Erkrankungen sind mit einem Absterben retinaler Ganglienzellen vergesellschaftet und können zu einem Visusverlust bis hin zur Erblindung führen (7-9). In Deutschland gehören die genannten Erkrankungen zu den wichtigsten Erblindungsursachen (10). Die bisher eingesetzten Therapieoptionen sind in ihrer Gesamtheit, insbesondere bei retinalen Gefäßverschlüssen (11), nicht zufriedenstellend (4, 12), sodass die Situation nach therapeutischen Alternativen verlangt (13). Außerdem können etablierte Therapieverfahren durch neue Therapieansätze ergänzt werden.

Betulinsäure (siehe II.4. Betulinsäure) ist ein Triterpenoid natürlichen Ursprungs. Es kommt in Pflanzenbestandteilen vor, die in der traditionellen Medizin bereits seit Langem angewendet werden. Seit Mitte der 1990er Jahre ist Betulinsäure, zunächst als Therapeutikum gegen maligne Tumore, schließlich auch ins Interesse der evidenzbasierten Medizin gerückt. Neben ihren antitumoralen Eigenschaften wirkt Betulinsäure zudem antioxidativ, antientzündlich sowie neuroprotektiv und hat sich bei Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI, siehe V.1) verschiedener Organe als protektiv erwiesen. Ihre Auswirkungen auf retinale Ischämie-Reperfusionsschäden waren bisher unbekannt, jedoch machen ihre chemischen Eigenschaften und ihre geringe Toxizität sie zu einem interessanten Therapieansatz.

Bei der Entstehung von retinalen Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI) sind verschiedene Pathomechanismen beteiligt, zu denen oxidativer Stress, die Exzitotoxizität, die Überladung der Zelle mit Calcium sowie die (sterile) Entzündung zählen (siehe II.2.4). Dabei ist der oxidative Stress kein alleinstehendes Phänomen, sondern macht auch einen Teilaspekt weiterer pathophysiologischer Prozesse aus (siehe II.2.3.2).

Es kommt zu oxidativem Stress (in einer Zelle oder einem Gewebe), wenn ein Ungleichgewicht zwischen (Pro-) Oxidantien (wie reaktiven Sauerstoffverbindungen

[ROS]) und Antioxidantien entsteht, bei dem die prooxidative Seite überwiegt. Damit sind neben den absoluten Auswirkungen der Betulinsäure auf den oxidativen Stress auch die pro- und antioxidative Seite dieses bei Ischämie-Reperfusionsschäden gestörten Gleichgewichts als eigene Gesichtspunkte interessant.

Zum differenzierteren Verständnis ebendieser beiden Seiten des oxidativen Gleichgewichts können verschiedene pro- und antioxidative Enzyme herangezogen werden. Der Einfluss der Betulinsäure auf die Genexpressionen dieser Enzyme bei retinalen Ischämie-Reperfusionsschäden liefert Einblicke in die Wirkmechanismen dieses potentiellen Therapeutikums. Die jeweiligen Genexpressionen der Enzyme unter Placebo bei Ischämie-Reperfusionsschäden stellen hierfür die Vergleichsbasis dar.

Darüber hinaus trägt diese Untersuchung zur Beantwortung der Frage bei, welche Enzyme längerfristig in retinale Ischämie-Reperfusionsschäden involviert sind, da die Analyse für beide Vergleichspartner nach acht Tagen Reperfusion stattfindet. In die Untersuchung wurden hierfür sowohl prooxidative Enzymen eingeschlossen, die wichtige Quellen reaktiver Sauerstoffverbindungen sind (NADPH-Oxidasen 1, 2, 4), als auch ihre wichtigsten antioxidativen Gegenspieler (Superoxiddismutasen 1-3, Katalase, Glutathionperoxidase 1, Hämoxygenase 1).

Durch ROS kann nicht nur oxidativer Stress entstehen, sondern über die Reaktion von ROS mit Stickstoffmonoxid (NO) ist auch die Bildung reaktiver Stickstoffverbindungen (RNS) und somit das Auftreten von nitrosativem Stress möglich. NO wird von den Enzymen aus der Familie der NO-Synthasen (NOS) gebildet, die unter bestimmten Bedingungen jedoch auch zu ROS-Produktion beitragen (siehe II.2.3). Da die NOS hiermit sowohl für den oxidativen als auch für den nitrosativen Stress bei Ischämie-Reperfusionsschäden von Bedeutung sind, werden ihre Genexpressionen und die Wirkung der Betulinsäure hierauf ebenfalls untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, Antworten auf die Frage zu finden, ob die Betulinsäure bei retinalen Ischämie-Reperfusionsschäden protektiv wirkt und über welche Enzyme sich ihre Wirkung entfalten könnte.

II. Literaturdiskussion

1. Epidemiologische Bedeutung retinaler Ischämie-Reperfusionsschäden

Zu den wichtigsten ophthalmologischen Erkrankungen, bei denen ischämische Schädigungen und oxidativer Stress von Bedeutung sind, zählen das Glaukom und die diabetische Retinopathie. Aber auch arterielle Gefäßverschlüsse in der Retina und die Retinopathia praematurorum sind von diesen Phänomenen betroffen (3-6).

Anhand der Gesundheitsberichtserstattung des Statistische Bundesamtes und des Robert-Koch-Instituts kann die Relevanz dieser Erkrankungen in einer Industrienation wie Deutschland eingeordnet werden. Hierbei werden über die Schwerbehindertenstatistik, (große) regionale Studien und das Landesblindengeld Schätzwerte für Deutschland gewonnen (10):

In einer Studie im Rheinland haben sich 2006 für diese Region neben der altersbedingten Makuladegeneration (40,7%), das Glaukom (15,4%) und die diabetische Retinopathie (9,7%) als wichtigste Erblindungsursachen herauskristallisiert. Schätzungsweise machen damit diese Erkrankungen, die mit retinalen IRI einhergehen, etwa ein Viertel der Erblindungsursachen aus. Von Blindheit und Sehbehinderung sind in Deutschland allein im Kollektiv der Personen mit Schwerbehinderung über eine halbe Million Menschen betroffen. Bei über 60% dieser Beeinträchtigten stellen Blindheit oder Sehbehinderung auch die schwerste Einschränkung dar. In der weiten Mehrzahl der Fälle (85%) ist die Erblindung hierbei Folge einer Erkrankung (10).

Der retinale IRI und seine Therapie sind daher wichtig bei Erkrankungen, die in Industrienationen wie Deutschland wichtige Erblindungsursachen auszumachen und einen erheblichen Anteil der Bevölkerung zu betreffen scheinen.

2. Pathomechanismen bei Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI)

Bei einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion der Retina kommt es zur Initiierung einer Vielzahl von Prozessen und Wechselwirkungen zwischen diesen Mechanismen, deren genaue zeitliche Abfolge unklar ist (14). Deshalb kann die hier gewählte Reihenfolge, in der diese Prozesse vorgestellt werden, auch nur dem besseren Verständnis dienen und nicht den genauen zeitlichen Verlauf eines IRI widerspiegeln. Die Retina ist zwar eine Ausstülpung des Diencephalons und weist viele Ähnlichkeiten mit dem Gehirn auf (14-16), weshalb Ergebnisse von Studien am Gehirn auf diese extrapoliert werden und umgekehrt (14, 15, 17), allerdings verfügt sie über eine größere Ischämietoleranz (14, 18). Diese liegt bei Mäusen bei unter 30 Minuten und für die menschliche Retina wird eine Dauer von mehr als 60 Minuten angenommen (14). Im Gegensatz hierzu hat das Gehirn von Mäusen eine Ischämietoleranz von unter fünf Minuten (Wüstenrennmaus) (19).

Die verschiedenen Prozesse, die als Reaktion auf ein Ischämie-Reperfusion-(IR)-Ereignis initiiert werden, können anhand von Beobachtungen an Gehirn und Retina einer frühen und einer späten Phase zugeordnet werden: zu den frühen Mechanismen bei einem IRI zählen die Exzitotoxizität, die Überladung der Zelle mit Calcium und der oxidative Stress, während Zelltod und Entzündungsprozesse zu den späteren Ereignissen zählen (14, 20, 21). Der Übergang in die späte Phase scheint in der Retina nach 24 Stunden Reperfusion stattgefunden zu haben, da eine Analyse der regulatorischen Netzwerke in diesem Organ zeigt, dass nach 24 Stunden Reperfusion der Zelltod das gemeinsame Element dieser Netzwerke ist und nach sieben Tagen Entzündungsprozesse im Vordergrund stehen (20).

2.1 Exzitotoxizität

Die inadäquate Durchblutung des Gewebes führt während der Ischämie zu einem Missverhältnis zwischen Bedarf und Versorgung mit Sauerstoff (O₂), Glukose und anderen Nährstoffen (5, 14, 20, 22), das einen Adenosintriphosphat-(ATP)-Mangel zur Folge hat (23, 24). In der Retina besteht ein hoher O₂- und Glukosebedarf (5), denn sie zählt wie das Gehirn zu den Geweben mit hoher Stoffwechselaktivität (21, 24, 25). Insbesondere retinale Ganglienzellen (*RGC, engl. retinal ganglion cells*) reagieren aufgrund ihrer langen und metabolisch kostspieligen Axone sensibel auf eine gedrosselte Energiezufuhr (9). ATP-getriebene Ionenpumpen wie die Natrium-Kalium-ATPase werden beeinträchtigt (14, 23) und Ionenverteilungsstörungen (14, 23),

Störungen bei der Repolarisation (14) und eine massive Neurotransmitterfreisetzung treten auf (14, 22).

Diese überschießende Neurotransmitterfreisetzung führt zur Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren während der Reperfusionphase (14, 22). Hierbei kommt es durch Glutamat, den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter in der Retina (14, 26), zu einer Schädigung der retinalen Zellen: der sogenannten Glutamatexzitotoxizität (14, 21, 22, 27, 28). Neben der Depolarisation (22) bzw. der gestörten Ionenverteilung (3) kann auch die Beeinträchtigung der Wiederaufnahme (3, 14, 21, 26, 29) oder des Abbaus (14, 30) von Glutamat die extrazelluläre Glutamatakkumulation in der Retina oder im Gehirn begünstigen.

Glutamat stimuliert seine ionotropen und metabotropen Rezeptoren in der Retina (3, 14, 21, 22). Über die ionotropen Rezeptoren, also den N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-(AMPA)- und Kainat-Rezeptor, kommt es unter anderem zum Einstrom von Natrium- sowie Kaliumkationen (Na^+ , K^+) (3, 14, 22). Dies verstärkt die Depolarisation und führt zu einer Hyperosmolarität. Auf dieser Hyperosmolarität des Intrazellularraums folgt ein Wassereinstrom und eine damit einhergehende Zellschwellung (3, 14). Letztere ist Ausdruck der akuten Exzitotoxizität in Form eines zytotoxischen Ödems, welches bis zur Zellyse führen kann (14). Die verzögerte Exzitotoxizität wirkt sich über die Überladung der Zelle mit Calcium aus (14, 27, 31), zu der auch die metabotropen Glutamatrezeptoren beitragen (14), wenngleich in geringerem Ausmaß als ihre ionotropen Verwandten (22). Von der Exzitotoxizität sind RGC stärker als andere retinale Neurone (beispielsweise Amakrinzellen) betroffen (14).

2.2 Überladung der Zelle mit Calcium

Die Überladung der Zelle mit Calcium ist ein zentrales Element des Zelltodes von RGC und anderen Neuronen (14, 22, 32). Durch den NMDA-Subtyp der Glutamat-Rezeptoren kann es zu einem direkten Einstrom von Calcium kommen (22, 31, 33). Die Depolarisation u.a. durch AMPA hingegen aktiviert spannungsabhängige Calciumkanäle, die zur Progression der Calciumakkumulation beitragen (14, 22). Außerdem ist als Folge der beeinträchtigten Na^+ - K^+ -ATPase und der Glutamat-stimulierten Ionenströme der Natriumgradient verringert (14), sodass dem Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) die treibende Kraft zur Senkung des intrazellulären Calciumspiegels abhandenkommt (22, 34). Die Ischämie (22) bzw. die daraus resultierende Azidose (14) beeinträchtigen zudem die Speicherung von Calcium

beispielsweise im endoplasmatischen Retikulum. Auch aktiviert das azidotische Milieu säureempfindliche Natriumkanäle (ASIC, acid sensing ion channels) (22), die ebenso wie mechanosensitive rezeptoraktivierte Ionenkanäle (*TRP-Kanal, engl. transient receptor potential channel*) (9, 22) zum Calciumeinstrom beitragen. Insbesondere der Subtyp TRPV4 (*engl. transient receptor potential vanilloid isoform 4*) ist auf RGC vertreten und kann durch die Zellschwellung oder durch mechanischen Stress als Folge der Erhöhung des Intraokular drucks (*IOP, intraocular pressure*) aktiviert werden (9). Neben dem Effekt der Glutamat-Freisetzung tragen bei IR-Ereignissen durch IOP-Erhöhung also auch weitere Prozesse zur Calciumüberladung bei.

Wenn die zytoplasmatische Calciumkonzentration einen kritischen Wert und eine kritische Dauer überschreitet, führt dies zum Zelltod (Apoptose, Nekrose) (3, 14, 22, 35). Es kommt zur (Über-)Aktivierung von Proteasen, Lipasen, Phosphatasen und Endonukleasen, sodass auf die Überladung der Zelle mit Calcium eine Schädigung des Zytoskeletts, der Peptide, der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und weiterer Zellbestandteile folgt (9, 14, 22, 36). Unter den aktivierten Enzymen befinden sich unter anderem die calciumabhängigen, konstitutiven Stickstoffmonoxidsynthasen (cNOS) (22, 37). Diese leisten einen Beitrag zur Glutamatexzitotoxizität (38) und sind darüber hinaus im Kontext des oxidativen Stresses relevant (siehe II.2.3). Auch betroffen sind die Phospholipase A₂ (14), die für den Arachidonsäurestoffwechsel Relevanz hat (3, 14, 21), und die zytoplasmatischen Cysteincaspasen Calpain (14, 22). Letztere tragen zur Störung der Calciumhomöostase (22) und durch die Transformation der Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase zum oxidativen Stress bei (14).

Neben der Aktivierung verschiedener Enzyme wirkt sich die zytosolische Überladung mit Calcium auch auf die mitochondrialen Calciumkonzentrationen aus (14, 22, 39). Es kommt ebenfalls zu einem Anstieg der intramitochondrialen Calciumlevel (22, 27), wodurch die ATP-Synthese gestört (14, 22), die Entstehung von oxidativem Stress gefördert (22, 27) und die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (*engl. mitochondrial permeability transition pore, MPTP*) begünstigt wird (14, 22, 27). Aufgrund der MPTP-Öffnung können Apoptose-induzierende Substanzen wie Cytochrom c, Smac/DIABLO oder pro-Caspasen aus dem Mitochondrium freigesetzt werden (14, 22, 27) und den Zelltod fördern.

Die Calciumüberladung kann somit über eine Vielzahl von Mechanismen, die Verbindungen zu anderen pathologischen Prozessen aufweisen, zur Zellschädigung und zum Zelltod führen.

2.3 Oxidativer Stress

Das Ungleichgewicht zwischen den pro- und antioxidativen Elementen einer Zelle zugunsten der pro-oxidativen Kräfte wird als oxidativer Stress bezeichnet (6, 25, 40-42). Sowohl ein Überschuss pro-oxidativer Elemente als auch ein Mangel an antioxidativen Schutzmechanismen kann diesen Zustand hervorrufen (25, 40, 41). Eine wichtige Ursache ist die (vermehrte) Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS, *engl. reactive oxygen species*), die bei der Pathogenese des IRI ausschlaggebend sind (6, 14, 43). Dieser Anstieg der ROS-Produktion kann fast direkt mit Beginn der Reperfusion festgestellt werden (24).

ROS enthalten Sauerstoff in einem angeregten Zustand (40) und viele ihrer Vertreter sind reaktionsfreudige, instabile Radikale (6). Sie treten unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Zelle auf (25, 30, 41, 42) und sind als Teil von Signalkaskaden beispielsweise in Proliferation, Genexpression oder Immunabwehr involviert (25, 42, 44). Unter ihre typischen Vertreter fallen Hyperoxid (auch als Superoxid bezeichnet, $O_2^{\cdot -}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) (6, 25, 30, 43, 45). Im Auge und damit auch in der Retina ist zudem Singulett-Sauerstoff (1O_2) relevant, da dieser in fotochemischen Reaktionen mit Fotosensibilisatoren wie Lipofuszin gebildet werden kann und ebenfalls zu den ROS zählt (25, 40).

Als zentrales oder Ursprungsmolekül der ROS wird $O_2^{\cdot -}$ bezeichnet, da aus ihm bzw. über es die anderen ROS gebildet werden können (24, 40, 46, 47). $O_2^{\cdot -}$ selbst wird (vorwiegend) durch vier Systeme produziert: die NADPH-Oxidasen (NOX), die entkoppelten Stickstoffmonoxid-Synthasen (ucNOS, *engl. uncoupled NOS*), Enzyme der mitochondrialen Atmungskette sowie die Xanthinoxidase (XO) (6, 14, 21, 24, 30, 42, 48). Im Falle der ubiquitären NOX ist die $O_2^{\cdot -}$ - Bildung (bzw. H_2O_2 -Bildung) ihre physiologische Funktion (42, 46, 47, 49), während dies für die anderen Systeme nicht oder nur eingeschränkt gilt. Die Entkopplung der NOS führt zum Verlust ihrer eigentlichen Funktion, der NO-Produktion und zu der an ihre Stelle tretenden $O_2^{\cdot -}$ -Bildung (24, 48). Auch die XO ist ein modifiziertes Enzym, das im Gegensatz zu seinem Alter Ego, der Xanthindehydrogenase, aufgrund eines anderen Elektronenakzeptors zur Bildung von ROS führt (14, 24). Sie kommt vor allem in Leber und Darm in hoher Konzentration vor, ist aber auch im Gefäßsystem relevant (24). Hier könnte sie bei IR-Ereignissen den oxidativen Stress über die Adhäsion und Infiltration von NOX-haltigen Leukozyten fördern, die wesentlich für die Entstehung des IRI zu sein scheinen (24, 50, 51). Die mitochondriale Elektronentransportkette der oxidativen

Phosphorylierung weist einen physiologischen Elektronenverlust auf. Hierbei entstehen aus bis zu 5% des umgesetzten Sauerstoffs (O_2) ROS (41, 42, 52-54). Damit sind Mitochondrien in der Retina, dem Gewebe mit der höchsten Stoffwechselaktivität im Körper (6, 14, 25), eine wichtige (physiologische) ROS-Quelle (24, 25). Unter pathologischen Bedingungen (wie IR-Ereignissen) ist in den Mitochondrien auch ein vermehrter Elektronenverlust und eine konsekutiv gesteigerte ROS-Produktion möglich (22, 24, 25).

$O_2^{\cdot-}$ kann spontan zu H_2O_2 mutieren (6, 40), diese Reaktion wird durch die Superoxiddismutase (SOD) allerdings etwa um den Faktor 10.000 beschleunigt (40). Während $O_2^{\cdot-}$ vorwiegend an das Kompartiment seiner Entstehung gebunden ist (31) und wie 1O_2 eine Halbwertszeit von Mikrosekunden hat (41), kann das ungeladene H_2O_2 sich per Diffusion (aufgrund der größeren Halbwertszeit) in andere Kompartimente ausbreiten (55-59). Seine Halbwertszeit liegt im Bereich von Minuten, zudem ist es kein Radikal (57) und weniger toxisch als $O_2^{\cdot-}$ (56, 57). Durch die Dismutation wird somit die Toxizität gemindert, aber gleichzeitig der Kreis, in dem die ROS wirken können, vergrößert (56, 57). Aus H_2O_2 kann über die Fenton-Reaktion der reaktivste (25, 41) und schädlichste (42) Vertreter der ROS, das $\cdot OH$ entstehen (60). Diese Reaktion benötigt ein Übergangsmetall wie Kupfer (Cu[II]), Eisen (Fe[II]) etc. als Katalysator (6, 40, 57, 60), wobei in vivo vor allem die eisenkatalysierte Reaktion abzulaufen scheint ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$) (41). Das hierfür benötigte Eisen kann während der Ischämie bzw. durch oxidativen Stress freigesetzt werden (43, 61) (siehe auch unten). Auch die Haber-Weiss-Reaktion, die sich die Fenton-Reaktion zunutze macht (41), benötigt einen solchen Katalysator und beschreibt die Bildung von $\cdot OH$ aus H_2O_2 und $O_2^{\cdot-}$ (42) oder 1O_2 (6). Die Halbwertszeit von $\cdot OH$ liegt im Bereich von Nanosekunden (41) und es entsteht auch in der Retina beim IRI (45).

Der antioxidative Zellschutz besteht aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponenten (6, 25, 40). Zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen zählen die oben bereits erwähnten SOD, die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPX) (6, 25, 30, 40, 42). Aber auch die durch (oxidativen) Stress induzierbare Hämoxxygenase 1 (HO1) (61, 62) nimmt vermutlich eine wichtige Rolle ein (63-65). Sie ist im Gegensatz zu den anderen genannten Enzymen zwar nicht direkt in den Abbau der ROS involviert, scheint jedoch ihre antioxidativen Eigenschaften über ihre Produkte zu entfalten (66). Unter die nicht-enzymatischen Komponenten fallen beispielsweise die Vitamine C und E sowie Glutathion (GSH) (6, 25, 40, 67).

Werden diese antioxidativen Schutzmechanismen überwältigt, kommt es zur „oxidativen Überflutung“ (40), wodurch die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt wird (14, 24, 25). Die ROS greifen verschiedene Zellbestandteile an und führen über Schädigungen zu deren Dysfunktion (14, 40-42, 45) und ggf. zum Zelltod (25, 30, 41, 43, 68).

So enthalten die Zellmembranen mehrfach ungesättigte Fettsäuren, deren Doppelbindungen ein Angriffspunkt für ROS sind (25). Abgesehen von dem hohen (Lipid)Stoffwechsel (40, 43) ist die Retina auch durch ihren großen Gehalt an ebendiesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (43) u.a. in den Fotorezeptoren (6, 25) ein empfindliches Ziel für oxidativen Stress (6, 40, 42, 69). ROS können eine Kettenreaktion auslösen, die zur (progressiven) Lipidperoxidation führt (40, 41, 43). Dadurch wird die Membranfluidität verändert und membranständige Proteine (wie Ionenpumpen) können beeinflusst werden (14, 41, 42). Zellschwellung und -tod (Apoptose bzw. Ferroptose) sind mögliche Folgen der Lipidperoxidation (14, 41, 68). Peptiden, wie Proteinen oder Enzymen, drohen ebenfalls oxidative Veränderungen durch ROS (6, 25, 43). Insbesondere Thiolgruppen und Eisen-Schwefel-Cluster sind innerhalb dieser Moleküle Angriffspunkte (14, 41, 70) und ROS können Eisen-Schwefel-Cluster-haltige Enzyme inaktivieren (70-73). Hierbei kann Eisen freigesetzt werden (71-73) und zur oben beschriebenen Fenton-Reaktion beitragen. Oxidierte Proteine denaturieren leichter und verlieren hierüber ihre Funktionalität (25, 41). Von diesen Prozessen sind auch antioxidativ wirkende Enzyme, beispielsweise die SOD oder GPX, betroffen (70, 74). Die DNA ist sowohl im Kern als auch in den Mitochondrien ein weiteres potentiell Ziel oxidativer Veränderungen (6, 41, 43). Stickstoffhaltige Basen wie Guanin oder das Rückgrat aus Pentose und Phosphat können angegriffen werden (25, 41), wodurch die Wahrscheinlichkeit für Mutationen oder Strangbrüche steigt (6, 41, 43). Im Gegensatz zu Proteinen oder der mitochondrialen DNA verfügt die Kern-DNA allerdings über ein größeres Bataillon an Reparaturmechanismen (25, 41). Diese können einerseits zwar (drohende) Funktionseinbußen der DNA verringern, andererseits aber möglicherweise die Gesamtsituation einer ischämischen Zelle durch eine Erschöpfung der ATP-Reserven verschlimmern (21).

2.3.1 Nitrosativer Stress

Neben den direkten Wirkungen der ROS auf die Zellbestandteile kann die Bildung von reaktiven Stickstoffverbindungen (*RNS, engl. reactive nitrogen species*) aus ROS ebenfalls zur Zellschädigung beitragen: $O_2^{\cdot-}$ reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) aufgrund der freien Elektronen schnell zu Peroxynitrit ($ONOO^-$), einem Vertreter der RNS (6, 14, 48, 52, 75). Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hierbei etwa fünf- bis zehnmal höher, als der Abbau von $O_2^{\cdot-}$ durch die Superoxiddismutase (76).

$ONOO^-$ ist ein starkes Oxidans (50, 52), das neben dem Angriff auf Eisen-Schwefel-Cluster und Thiol-Gruppen auch über Nitrosylierungen sowie Nitrierungen (z.B. Bildung von Nitrotyrosin) zu Schädigungen bzw. Funktionsverlusten von Lipiden, Proteinen und DNA führen kann (6, 48, 52, 76). Nitrotyrosin wird als Marker für nitrosativen Stress *in vivo* genutzt (52, 76), der als Konsequenz von oxidativem Stress entstehen kann. Die Bildung von $ONOO^-$ führt außerdem zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO, wodurch dessen protektiven Effekte eliminiert werden (77, 78). NO-Quellen sind die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS), die sowohl in retinalen Zellen, als auch in den infiltrierenden Leukozyten vorkommen (14, 30) und selbst ebenfalls zur ROS-Produktion beitragen können (siehe II.2.3).

2.3.2 Oxidativer Stress und Pathomechanismen des IRI

Zwischen dem oxidativen Stress und der bei IR-Ereignissen in der Retina auftretenden Glutamat-Exzitotoxizität sowie der postischämischen Entzündungsreaktion gibt es Zusammenhänge bzw. Querverbindungen: neben dem zytotoxischen Ödem (3, 14) und der Überladung des Intrazellularraums mit Calcium (14, 21, 22) geht die Exzitotoxizität von Glutamat auch mit der Bildung von ROS und RNS einher (14, 22, 30) und kann hierüber zum Zelltod führen (33). Durch die Calciumüberladung der Zelle als Folge der Aktivierung der Glutamatrezeptoren kann eine mitochondriale Dysfunktion auftreten, die eine gesteigerte ROS-Produktion mit sich bringt (22, 79). Die wichtigste Quelle der ROS, die als Folge der NMDA-Rezeptoraktivierung gebildet werden, scheint jedoch die NOX (NOX2) zu sein (31, 53). Hierbei kommt es vermutlich calciumunabhängig zu einer Aktivitätssteigerung der NOX mit konsekutivem Anstieg von $O_2^{\cdot-}$ (31, 33). Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle der ROS im Rahmen der Exzitotoxizität liefert die Beobachtung, dass antioxidative Enzyme wie die SOD oder die HO1 das Ausmaß der Exzitotoxizität mindern können (33, 73, 80, 81). Auch die iNOS bzw. die calciumabhängigen cNOS sind über die Bildung von RNS an der Exzitotoxizität beteiligt (z.B. am Kainat-Rezeptor beobachtet) (30, 82, 83). Zudem

scheinen ROS das Ausmaß der Exzitotoxizität über eine Hemmung der Wiederaufnahme und des Abbaus von Glutamat zu vergrößern (26, 30).

Die NOX hingegen spielen nicht nur bei der Exzitotoxizität eine Rolle, sondern sind auch in die postischämische retinale Entzündungsreaktion verwickelt (7). Die NOX2 kommt in besonders hoher Konzentration in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und weiteren Phagozyten vor (24, 46, 71). Diese infiltrieren das hypoxische Gewebe aufgrund dessen Produktion von Chemokinen (14, 23, 77) z.B. in retinalen Mikroglia (7). Zu den chemotaktisch wirkenden Substanzen zählen auch die ROS selbst (43, 72), die zudem die Adhäsion der Leukozyten fördern (24, 77) und somit eine weitere ROS-Quelle in Form von (aktivierten) Phagozyten zum Gebiet des IRI hinzufügen (52, 83-86). Dieser Prozess tritt auch in der Retina auf (5, 14, 24). Ein Zusammenhang zwischen der ROS-Produktion im Gewebe und der Leukozytenakkumulation scheint zu bestehen (24, 77). In der Retina kann zudem durch die antioxidativ wirkenden SOD (45) sowie die HO1 (bzw. ihr Produkt, CO) die Aktivierung von sowie die Infiltration durch Makrophagen vermindert werden (62, 64, 83, 87, 88), woraus sich ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von oxidativem Stress als wichtigem Element der Entzündungsreaktion ergibt (7). Oxidativer Stress und die Leukozyteninfiltration sind wichtige Merkmale des retinalen IRI (62).

Darüber hinaus fördern sowohl die Entzündungsreaktion (bzw. der Tumornekrosefaktor (TNF) α und Interleukin-(IL)-1 β), als auch die Glutamatexzitotoxizität (Calciumanstieg, osmotischer Stress) die Frei- und Umsetzung von Arachidonsäure (3, 14, 21, 89). Dies kann neben der Produktion von Eicosanoiden (14) zur Entstehung von ROS führen (30, 84, 90, 91) und stellt auch einen relevanten Mechanismus in der postischämischen ROS-Produktion dar (14). Auch der Stoffwechselweg der Arachidonsäure weist Wechselwirkungen mit den pro- und antioxidativen Enzymen auf: Er beeinflusst die Genexpression von SOD1 (92), fördert die NOX-Aktivität (24, 89) und wird von der GPX1 sowie der HO1 bzw. ihren Produkten in hemmender Weise moduliert (88, 93-96).

Der oxidative Stress ist damit kein isolierter Prozess beim retinalen IRI, sondern vielmehr (auch) Teil anderer Pathomechanismen.

2.4 Entzündungsreaktion (Neuroinflammation)

In der Retina kann es durch die nekrotische und apoptotische Zellschädigung zur Neuroinflammation kommen (5), die das Überleben der umliegenden Zellen mindert und neurotoxisch wirkt (4). Die Freisetzung von Zellbestandteilen, die zu den „Alarminen“ (auch *engl. danger/damage-associated molecular patterns*, DAMPs) gehören, kann über bestimmte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PPRs) zur Bildung eines Inflammasoms führen (5, 89). Dieser multimere Komplex bildet mithilfe der Caspase-1 Zytokine, welche die Entzündungsreaktion fördern (5, 89). Hierbei sind insbesondere IL-1 β (89, 97), TNF α (97, 98) und der von ihnen aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B (93, 99) interessant, da sie zentrale Rollen in den Entzündungskaskaden einnehmen und Verbindungen zum oxidativen Stress aufweisen:

NF- κ B kann durch oxidativen Stress bzw. ROS (z.B. von der NOX abstammend) aktiviert werden (46, 72, 73, 93, 100) und reguliert über 500 Gene, darunter proinflammatorische Gene und ihre Gegenspieler (89). Postischämisch ist auch in der Retina eine NOX(2)-abhängige NF- κ B-Aktivierung beobachtet worden (51). Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit bei IR-Ereignissen ist der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF), der im hypoxischen Milieu (101) oder durch ROS stabilisiert wird (102). HIF und NF- κ B verstärken sich wechselseitig (102).

NF- κ B fördert in Endothelzellen mittels Chemokinen und Adhäsionsmolekülen die Leukodiapedese und verbessert das Überleben von Leukozyten im Entzündungsbereich (77, 89). Wie bereits dargestellt, fördert auch oxidativer Stress im Gefäßsystem die Leukozyteninfiltration. Diese Zellen schädigen das infiltrierte Gewebe abgesehen von ihrer ROS-Produktion zusätzlich durch die Freisetzung von Proteasen und Elastasen und durch eine progrediente Störung der Blut-Hirn- bzw. Blut-Retina-Schranke (5, 21, 23). Diese Schrankenstörung wird neben der Infiltration auch über oxidativen Stress hervorgerufen (5, 24) und kann aufgrund erhöhter Permeabilität zu einem vasogenen Ödem führen (3). Sowohl die aus dem Ödem resultierende Steigerung des Gewebedrucks (vorwiegend im Gehirn) als auch die Akkumulation von Leukozyten in Gefäßen können über die Okklusion von Kapillaren in ein No-Reflow-Phänomen bzw. eine Verschlechterung der Perfusion münden (14, 77).

Weiterhin steigert NF- κ B die Genexpression der NOX (NOX1, NOX2, NOX4) (46) und der iNOS (57, 103-105), sodass im Bereich der Entzündung die Bildung von ROS und RNS begünstigt wird (14). Auch vermittelt dieser Transkriptionsfaktor einen Anstieg

von TNF α (46, 67) und IL-1 β (9, 67), die auch postischämisch in der Retina auftreten (14, 106) und ihrerseits NF- κ B induzieren können. Somit scheinen sowohl NF- κ B (83, 99, 100) als auch der Anstieg von TNF α und IL-1 β (14) insgesamt einen überwiegend ungünstigen Einfluss auf den Ausgang des IRI in Gehirn oder Retina zu haben und über die NOX den oxidativen Stress zu fördern (46, 49).

Weiterhin scheinen direkte oder indirekte Wechselwirkungen von NF- κ B, TNF α und IL-1 β auf antioxidative Enzyme [SOD, CAT, GPX4, HO1, siehe (57, 62, 70, 72, 73, 92, 95, 101, 103, 104, 107-110)] und umgekehrt [GPX, HO1 bzw. ihre Produkte, siehe (56, 61, 88, 97, 111-113)] zu bestehen.

Im Rahmen der IR-assoziierten Neuroinflammation in Gehirn und Retina kommt es weiterhin zur Aktivierung von Gliazellen (7, 46, 51, 90, 114). Genauer gesagt ist in der Retina eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten beobachtet worden (7, 115), welche (ebenso wie ihre zerebralen Pendanten) NOX-Isoformen enthalten (46, 99, 116). Beim IRI und unter hypoxischen Bedingungen in Zellkulturen ist zudem eine ROS-Produktion dieser Zellen beschrieben worden (7, 99, 117). Hierbei scheint insbesondere die NOX2 zum oxidativen Stress in der retinalen und zerebralen Neuroinflammation sowie zur Aktivierung von NF- κ B beizutragen (7, 46, 51, 99). Aber auch die NOX1 und NOX4 haben postischämisch eine mögliche proinflammatorische Wirkung in der Retina (7). Durch eine Hemmung der NOX oder durch die Verstärkung antioxidativer Enzyme, wie der GPX1 oder HO1 fällt die Neuroinflammation geringer aus (7, 50, 51, 88, 90). Die Entzündungsprozesse in Retina und Gehirn weisen demnach mehrere Verbindungen zum oxidativen Stress auf, welcher im Gehirn die postischämische Neuroinflammation reguliert (43). Als häufige Brücke zwischen diesen beiden Prozessen scheinen dabei die NOX zu dienen, wenngleich für die NOX4 auch protektive Effekte beschrieben worden sind (118-120).

3. Wichtige Enzyme bei Ischämie-Reperfusionsschäden

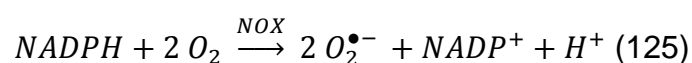
3.1. Die Nicotinamidadenindinucleotidphosphatoxidasen (NADPH-Oxidasen)

Die Familie der Nicotinamidadenindinucleotidphosphatoxidasen (NADPH-Oxidasen, NOX) besteht aus 7 Enzymen, zu denen die NOX1 bis NOX5 sowie die beiden dualen Oxidasen DUOX1 und DUOX2 zählen. Ihre gemeinsame Funktion besteht in der Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS), genauer gesagt von Hyperoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$) bzw. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (47, 49, 59).

Für den IRI in Gehirn und Retina sind jedoch nur die dort nachgewiesenen Isoformen NOX1, NOX2 und NOX4 von Interesse (46, 121-123). Die NOX 3 bzw. beide DUOX kommen vorwiegend im Innenohr bzw. der Schilddrüse vor (49, 124). Die NOX5 ist zwar beim Menschen (vermutlich auch in der Retina) vorhanden, fehlt aber im Genom der Nager und kann deshalb hier nicht miteinbezogen werden (46, 49, 116, 122).

Die Isoenzyme ähneln sich in Bezug auf ihren Aufbau und ihre Funktionsweise (46), sodass hier ein allgemeiner Überblick gegeben wird: es handelt sich um transmembranöse Proteine (46, 59), in deren Sequenz insbesondere die vier Histidinreste wichtig sind, welche die beiden prosthetischen Häm-Gruppen im Molekül verankern (46, 124). Das mit „NOX“ bezeichnete Genprodukt enthält zwar das katalytische Zentrum des Enzyms (47, 59), ist aber nur als Komplex funktionsfähig (59). Unerlässlich ist hierbei die Heterodimerisierung mit p22phox (46). P22phox wird alternativ als α -Untereinheit von Cytochrom b_{558} (Cyba) bezeichnet und ist wie die katalytische NOX-Untereinheit membranständig (47, 49). Die Komplexe der NOX1 und -2 enthalten zudem zytosolische Faktoren (47, 59). Hierzu gehören Aktivatoren (p67phox, noxa1), Organisatoren (p47phox, noxo1) und die G-Proteine Rac-1, -2, oder -3 (46, 47, 59), wobei in der Retina Rac-1 relevant ist (123). Diese formen einen zytosolischen Komplex (59), dessen Translokation an den membranständigen Heterodimer (p22phox&NOX) über den Organisator vermittelt wird (46, 47). Dort kommt es (vermutlich) über den Aktivator (47) zur Aktivierung des funktionsfähigen Gesamtkomplexes (46). Die NOX4 stellt einen Sonderfall dar und benötigt keine zytosolischen Faktoren (46, 47).

Verglichen mit der Struktur der NOX erscheint die von ihr katalysierte Reaktion eher einfach: Von NADPH werden zwei Elektronen über Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und die Häm-Moleküle transmembranös übertragen (59, 124) und reduzieren den molekularen Sauerstoff zu $O_2^{\bullet-}$ (46, 59). Ionenströme gleichen das entstehende Potential aus (59).



Die NOX sind über die Bildung von ROS in eine Vielzahl von Funktionen involviert, unter denen die Immunabwehr einen besonderen Stellenwert hat (46, 47, 49, 124). In der Retina sind sie insbesondere bei der Phagozytose im retinalen Pigmentepithel wichtig, beeinflussen aber auch die Perfusion und scheinen Anteil an verschiedenen Pathologien wie der diabetischen Retinopathie zu haben (46).

3.1.1 Die NADPH-Oxidase 1 (NOX1)

Die NOX1 hat viele alternative Benennungen, zu denen mitogene Oxidase 1 (*engl. mitogenic oxidase 1*, MOX-1), gp91-2 (46) oder auch NADPH-Oxidase-Homolog 1 (NOH-1) (126) zählen. Ein Nachweis der NOX1 ist in vielen Organen und Zelltypen erfolgt, vor allem in Colonepithelzellen und glatten Muskelzellen(46, 124), aber auch im Gehirn und der Retina bzw. in Neuronen und verschiedenen Gliazellen ist das Auftreten der NOX1 bestätigt worden (50, 116, 121, 122, 127).

Ihr funktionsfähiger Gesamtkomplex enthält neben NOX1, p22phox und Rac auch den NOX activator 1 (nox1) und den NOX organizer 1 (noxo1) (46, 47, 49), die auch in der Retina vorkommen (122). Obwohl noxo1 zu den zytosolischen Faktoren zählt, scheint er dauerhaft mit der Membran assoziiert zu sein (46, 127), möglicherweise aufgrund der fehlenden Notwendigkeit einer Konformationsänderung für diese Assoziation (47, 49). Die NOX1 weist eine geringe basale Aktivität auf, wobei deren Ausmaß zwischen Menschen und Mäusen variiert (46, 49, 128). Funktionell gesehen scheint die NOX1 in die Immunabwehr integriert zu sein und bei der Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung eine Rolle zu spielen, daher auch die Benennung als MOX-1 (46, 47, 49, 124, 129). Beim IRI der Retina und des Gehirns wird vor allem die Rolle der NOX2 betont (31, 50, 121), aber da es Hinweise auf eine substantielle Rolle der NOX1 beim retinalen IRI gibt (51, 122), ist sie hier von Interesse.

3.1.2 Die NADPH-Oxidase 2 (NOX2)

Die NOX2 wurde als erstes Mitglied der NOX-Familie zuerst in Phagozyten identifiziert und zunächst auch als Phagozytenoxidase (phox) bezeichnet. Weitere alternative Benennungen sind gp91phox oder β -Kette des Cytochrom b_{558} -Komplexes (Cybb). Cytochrom b_{558} ist das Heterodimer aus NOX2 und gp22phox (46, 49). Auch die weiteren Elemente des Gesamtkomplexes (46, 47, 59) tragen verwirrend viele Namen: Sie werden als neutrophile zytosolische Faktoren (*Ncf*, *engl. neutrophil cytosolic factor*), oder als p47phox (noxo2, Ncf1), p67phox (nox2, Ncf2) und p40phox (Ncf4) bezeichnet (122). P47phox und p67phox ähneln in ihren Funktionen dem

Organisator noxo1 und Aktivator noxa1 der NOX1 (46, 47). Das Element p40phox wirkt hingegen modulierend und scheint nicht essentiell zu sein (46, 59). Die NOX2 weist im Gegensatz zur NOX1 und NOX4 keine basale Aktivität auf (49). Ein möglicher Grund hierfür könnte ihre autoinhibitorischen Domäne im Organisator p47phox (49, 128) sein: diese fehlt dem NOX1-Organisator noxo1 und hat eine hemmende Wirkung auf die zytosolische Komplexbildung, welche durch Phosphorylierungen aufgehoben werden muss (46, 47, 49, 59, 128).

Neben NF- κ B ist PU.1 [auch Spi1 [spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene genannt (130)] ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der mehrere Elemente des NOX-Gesamtkomplexes (nox2, p47phox, p67phox) induziert (46).

Die NOX2 und die genannten essentiellen Komponenten treten zwar in besonders hoher Konzentration in myeloischen Zellen wie Phagozyten auf, allerdings lassen sie sich auch in einer Vielzahl anderer Gewebe und Zelltypen nachweisen (46, 49). Hierzu zählen auch das Gehirn bzw. Neurone und Gliazellen, sowie die Retina und ihre Ganglienzellen und andere retinale Zelltypen (51, 122, 123). Als weitere NOX2-Quelle kommen beim IRI Leukozyten (24, 71) infrage, welche die Retina oder das Gehirn infiltrieren (4, 14, 21). Einmal aktiviert hat die NOX2 die größte O_2^- -Produktion verglichen mit NOX1 oder NOX4 (49). Die hohe Syntheseleistung der NOX2 führt zu O_2^- -Konzentrationen, die auch als „respiratory burst“ oder „oxidative burst“ bezeichnet werden und beispielsweise in besagten Phagozyten auftreten (46, 129).

Die NOX2 ist besonders wichtig in der Immunabwehr. Wenn keine oder nur eine eingeschränkte NOX2-Aktivität vorliegt, entsteht das Krankheitsbild der septischen Granulomatose mit chronischen Infektionen, da vor allem die Abwehr katalasehaltiger Bakterien gemindert ist (46, 49, 124). Sie beeinflusst allerdings auch die Perfusion (47) und scheint beim zerebralen und retinalen IRI eine zentrale Rolle einzunehmen (7, 46, 51, 99).

3.1.3 Die NADPH-Oxidase 4 (NOX4)

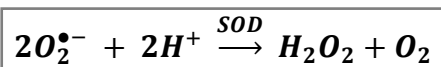
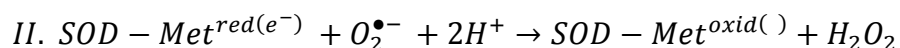
Die NOX4 wurde zuerst in der Niere identifiziert und heißt auch renale Oxidase (RENOX bzw. KOX-1) (46, 58, 124, 127). Sie ist genetisch entfernter mit der NOX1 und -2 verwandt, als diese untereinander (46, 49, 59) und teilt mehrere der bisher beschriebenen Charakteristiken nicht: so scheint sie ohne zytosolische Elemente allein durch die Heterodimerisierung mit p22phox ihre Funktionsfähigkeit zu erreichen (46, 47, 50). Außerdem ist sie das einzige NOX-Familienmitglied mit einer (nennenswerten) konstitutiven Aktivität (24, 46) und ihr Produkt ist H_2O_2 anstelle von O_2^- (46, 49, 50,

128) (bzw. reagiert vermutlich aufgrund einer speziellen, Protonen zur Verfügung stellenden Domäne (49) zügig zu diesem). Das Vorkommen der NOX4 ist ubiquitär (49), jedoch tritt sie besonders konzentriert in der Niere, sowie in verschiedenen Zellen des Gefäßsystems, insbesondere Endothelzellen, auf (46, 47). In Gefäßen könnte sie die häufigste Isoform sein (46, 127, 131). Sie findet sich in den zerebralen Gefäßen in hohen Konzentrationen (46, 50) und liegt auch in der Retina vorwiegend in Gefäßen vor (132). Weitere retinale und zerebrale Zellen, darunter auch Neurone, exprimieren sie aber ebenfalls (50, 122). Da sie zudem in Mitochondrien vorkommt, scheinen Wechselwirkungen mit diesen möglich (31, 49, 50).

Sie ist vermutlich, ähnlich der NOX1, in Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose und Alterung eingebunden (46, 47, 49, 124) und scheint im Auge Bedeutung für die Angiogenese und vaskuläre Pathologien in der Retina zu haben (131, 132).

3.2. Die Superoxiddismutasen

Die Superoxiddismutasen gehören zu den antioxidativ wirkenden Enzymen und bauen $O_2^{\bullet-}$ ab. Sie enthalten Metallionen als katalytische Cofaktoren, anhand derer eine Einteilung in Kupfer/Zink- (CuZnSOD), Mangan- (MnSOD), Eisen- (FeSOD) oder Nickel-SOD (NiSOD) möglich ist. Von diesen sind bei Säugetieren jedoch nur CuZn- und MnSOD relevant (133, 134). Es gibt bei Säugetieren, wie Menschen oder Mäusen, drei Isoformen, zu denen zwei CuZnSOD (SOD1, SOD3) und eine MnSOD (SOD2) zählen (72, 92, 135) und die jeweils einer subzellulären Hauptlokalisation zugeordnet werden können (siehe II.3.2.1-3). Die Verwendung unterschiedlicher Metallionen hängt vermutlich mit deren Verfügbarkeit während der Evolution zusammen (134). Davon unbeeinflusst katalysieren die Isoformen dieselbe Reaktion: $O_2^{\bullet-}$ wird zu H_2O_2 und Sauerstoff umgesetzt (72, 133, 134, 136). Zwar reagiert $O_2^{\bullet-}$ auch spontan zu H_2O_2 , jedoch wird durch die SOD dieser Prozess stark beschleunigt (40). Bei der katalysierten Reaktion handelt es sich, wie der Name der Enzymfamilie schon verrät, um eine Dismutation bzw. Disproportionierung, bei der das Metallion (Met) sowohl oxidiert als auch reduziert wird (72, 133, 134).



Die Reaktionsgeschwindigkeit ist hierbei ähnlich hoch wie die Diffusionsgeschwindigkeit (134, 137). Begünstigt wird sie durch die Proteinstruktur des

Enzyms, die $O_2^{\cdot-}$ über elektrostatische Anziehungskräfte zum katalytischen Zentrum leitet, das Redoxpotential der Metallionen optimiert und als Protonenquelle dient (133, 134). Das entstehende Produkt, H_2O_2 , gehört zwar ebenfalls zu den ROS, ist aber im Gegensatz zu $O_2^{\cdot-}$ kein Radikal und weniger toxisch (56, 57). Außerdem vermindert die SOD die Bildung von $ONOO^-$ aus NO und $O_2^{\cdot-}$, sodass der nitrosative Stress reduziert und die Verfügbarkeit von NO vermehrt werden (72). SOD bilden das erste Element in einer Reihe von Enzymen, welche ROS abbauen und die Zelle somit vor oxidativen Schädigungen bewahren (135). Allerdings produzieren sie gleichzeitig H_2O_2 und stellen damit das Ausgangsmolekül für die Bildung des toxischsten ROS, OH^{\cdot} , über die Fenton-Reaktion bereit (42, 60). Dennoch gehören sie, auch in der Retina (6, 40), zu den wichtigsten antioxidativen Schutzmechanismen (72, 84, 92, 134). Abgesehen hiervon sind sie auch in Entzündungsprozesse (92), die Angiogenese (72) und die Regulation des Vasotonus (72, 92) involviert und scheinen an der postischämischen Regeneration des Gewebes beteiligt zu sein (72). Auch zwischen Mutationen der SOD und verschiedenen Erkrankungen bestehen Verbindungen (54, 92, 134).

3.2.1 Die Superoxiddismutase 1 (SOD1)

Die vormals auch als Indophenoloxidase A (IPO-A) (138) bezeichnete SOD1 gehört zur Gruppe der CuZn-SOD, die ursprünglich den Namen Erythrocyuprein (133) trugen (33, 72, 92, 134, 135). Es handelt sich bei dem Enzym um ein Homodimer mit einem Gewicht von 32 kDa (72, 92, 135, 137), dessen zwei Untereinheiten je ein Kupfer- und ein Zinkion (Cu^{2+} , Zn^{2+}) enthalten (133, 134, 137). Während Cu^{2+} den für die Dismutation benötigten Cofaktor darstellt, dient Zn^{2+} der Stabilität des Moleküls und der Erhaltung der Funktion bei verschiedenen pH-Werten (72, 133, 137). Das katalytisch wichtige Cu^{2+} wird posttranslational mithilfe des Chaperons CCS (Copper Chaperone for SOD1) eingefügt, das zudem aktivierend wirkt und für die volle Enzymleistung benötigt wird (72, 137). Auch Glutathion stimuliert die Aktivität (72), während Metallionen, Schubspannung, H_2O_2 oder NO die Genexpression induzieren (92). H_2O_2 kann hingegen sowohl zu einer Produkthemmung (72), als auch zur Inaktivierung des Enzyms führen. Letztere kann durch die Bildung von OH^{\cdot} (aus H_2O_2) z.B. über die niedrige Peroxidase-Aktivität der SOD1 selbst mit konsekutivem Verlust von Cu^{2+} (133, 137) zustande kommen. Verglichen mit der SOD2 ist die SOD1 jedoch relativ unempfindlich gegenüber ROS oder RNS (70).

Die SOD1 findet sich in vielen Zellen und gilt als ubiquitär (92, 135, 139). So tritt sie auch in der Retina auf, wo sie die am häufigsten vorkommende Isoform darzustellen scheint (139, 140). Bezogen auf subzelluläre Kompartimente stellt das Zytosol allgemein ihre Hauptlokalisierung dar, jedoch ist sie unter anderem auch in den Mitochondrien, dem Kern (72, 92, 137, 141) und extrazellulär (135) vorhanden.

Die SOD1 ist neben ihrer protektiven Wirkung durch den $O_2^{\cdot-}$ - Abbau auch in verschiedene Kaskaden integriert und kann zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen (135). Störungen der Enzymfunktion scheinen mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert zu sein, darunter insbesondere die familiäre amyotrophe Lateralsklerose (133, 134), aber auch phänotypische Merkmale der Trisomie 21 (92). Eine verminderte SOD1-Aktivität ist, vermutlich auch in der Retina, mit beschleunigten Alterungsprozessen verbunden (139, 140). Dort kommt es bei ihrem Fehlen zu Veränderungen ähnlich einer altersabhängigen Makuladegeneration (139), welche passenderweise auch Verbindungen zum oxidativen Stress aufweist (142).

3.2.2 Die Superoxiddismutase 2 (SOD2)

Die SOD2 wird alternativ als Mangan-SOD (MnSOD) (54, 73, 134, 143, 144) oder in älteren Publikationen auch als Indophenoloxidase B (IPO-B) (145) bezeichnet. Es handelt sich bei Säugetieren um ein 96kDa schweres Homotetramer (72, 92, 135), das pro Untereinheit je ein Mangankation (Mn^{3+}) als spezifischen (72) katalytischen Cofaktor enthält (133). Statt Homologien zur SOD1 aufzuweisen, ähnelt das aktive Zentrum der SOD2 den (bakteriellen) FeSOD (72, 134). Außerdem enthält die SOD2 im Gegensatz zur SOD1 insgesamt neun Tyrosinreste, die potentielle Angriffsziele für ROS oder RNS darstellen (70).

Lokalisiert ist die SOD2 in der mitochondrialen Matrix. Sie kommt in einer Vielzahl von Zellen vor (53, 72, 73, 92, 133, 135), so auch ubiquitär in der Retina (84). In ihrer Aktivität entspricht sie ungefähr der SOD1, bezogen auf das Volumen der jeweiligen Wirkstätten (146).

In Mitochondrien entstehen unter physiologischen Bedingungen ROS aus bis zu 5% des umgesetzten O_2 (53, 54), wodurch sie die Hauptquelle der zellulären ROS-Produktion sind (54, 72, 73, 79, 134) und doppelt so hohe $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration wie das Zytoplasma aufweisen (146). Diese ROS können den Energiestoffwechsel (72, 73, 144, 147) und die Integrität der mitochondrialen DNA (73) stören. Das wichtigste antioxidative Element zur Erhaltung der mitochondrialen Homöostase ist die SOD2

(53, 72, 73). Abgesehen von ihren antioxidativen Eigenschaften wirkt sie auch antiapoptotisch, beispielsweise durch eine verringerte Cytochrom-c-Freisetzung oder Erhaltung des mitochondrialen Membranpotentials (53, 70, 73).

In die Mitochondrien gelangt die SOD2 nach ihrer Synthese aus nukleärer DNA über ein entsprechendes Signalpeptid (53, 72, 133, 144). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die SOD2 ist STAT3 (*engl. signal transducer and activator of transcription 3*) (53), aber auch HIF-2 α , der in Müllerzellen der Mausretina vorkommt, wirkt induzierend (148, 149). ROS und RNS können hingegen über die Bildung von Dityrosinbrücken oder Nitrotyrosin zu einer reduzierten Enzymaktivität führen (70).

Die Bedeutung der SOD2 zeigt sich eindrucksvoll an ihrem Knockout, der postnatal - trotz ausreichender Konzentrationen ihrer Isoformen - innerhalb weniger Wochen (10-18 Tage) letal endet (92, 144, 147). Es kommt zu Störungen in Geweben mit hohem Stoffwechselumsatz (144, 147) wie der Leber, dem Herzen und dem Gehirn. Auch in der Retina geht der Knockout mit einer schweren und schnellen Degeneration, ähnlich den zerebralen Veränderungen (144), einher (139). Die Aktivität der SOD2 scheint darüber hinaus Auswirkungen u.a. auf den Progress maligner Erkrankungen zu haben (70), und eine Verbindung zwischen SOD2-Polymorphismen und der exsudativen Form der altersabhängigen Makuladegeneration wird vermutet (54).

3.2.3 Die Superoxiddismutase 3 (SOD3)

Die SOD3 wurde als letzte Isoform bei Säugetieren beschrieben (101, 103) und wird auch als extrazelluläre SOD (ecSOD) bezeichnet (72, 84, 104, 150). Sie gehört wie die SOD1, zu der sie zu 60% homolog ist (92, 103, 104), zu den CuZnSOD (72, 92, 134, 135, 141) und enthält pro 32 kDa schwerem Monomer (101, 108) ebenfalls je ein Kupfer- und ein Zinkkation (Cu²⁺, Zn²⁺) (101, 103, 134). Meist tritt sie als Homotetramer (72, 92, 101, 104) auf, dessen Dimere im Gegensatz zur SOD1 über zwei stabilisierende Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (72, 134), aber auch andere Multimere kommen vor (101, 103, 108). Die SOD3 ist überaus robust gegenüber selbst extremen pH-Werten oder hohen Temperaturen (101, 103).

Ihre Hauptlokalisierung ist die extrazelluläre Matrix (ECM) (72, 92, 134, 135, 142), wohin sie aufgrund eines Signalpeptids sezerniert wird (72, 150, 151). Ihre N-terminale Glykosylierungsstelle dient der verbesserten Löslichkeit des Enzyms (72, 103, 104, 108), während die nur bei der SOD3 (104) vorkommende C-terminale Heparin-bindende Domäne [HBD, *engl. heparin-binding domain* (108) bzw. ECM-binding region (101)] die Bindung an Zelloberflächen (71, 72, 92, 101, 103, 108) ermöglicht.

Hierdurch befindet sie sich zu 90-99% in der gewebständigen Form (72, 103), die ihre Halbwertszeit verlängert (103).

Die SOD3 ist zwar nicht ubiquitär vorhanden (92, 108), tritt aber in kardiovaskulären Endothelzellen in hoher und im Gehirn sowie der Retina in mittlerer Konzentration auf (72, 84, 103, 108).

Auch in die SOD3 muss Cu^{2+} mittels weiterer Faktoren, namentlich Antioxidant 1 (Atox1) und Menkes ATPase (ATPase MNK, ATP7A) eingefügt werden (72, 104, 150), die auch für eine hohe Enzymaktivität notwendig sind (72). Atox1 wirkt zudem als Transkriptionsfaktor für die SOD3 (72, 108, 150). Eine Induktion können Zytokine wie Interferon (IFN) γ , IL-1 α oder IL-4 (zu TNF α finden sich widersprüchliche Angaben (101, 108)) hervorrufen. Auch hierbei kann NF- κ B beteiligt sein (92, 103, 104). Weitere positive Stimuli sind NO, Angiotensin II oder die diätetische Zufuhr von Cu^{2+} und Zn^{2+} (72, 92, 101, 103, 108), wohingegen manche Wachstumsfaktoren oder Homocystein die Genexpression hemmen (72, 92, 101) und H_2O_2 zu einer Produkthemmung führt (84, 101).

Die SOD3 schützt als einzige Isoform (101, 103, 152, 153) die Zellen und ihre Glykokalyx im Extrazellularraum vor oxidativem Stress (142). Ein postnatal herbeigeführter Verlust endet meist schnell letal, wohingegen ein pränataler Knockout vermutlich aufgrund von Kompensationsmechanismen weder fatal ist, noch zu phänotypischen Veränderungen führt (108). Neben ihrer antioxidativen Wirkung fördert sie durch ihre Lokalisation besonders die Bioverfügbarkeit von NO (72, 104, 154). Der relativ häufige R213G- (72, 101, 103, 108) und andere Polymorphismen weisen Assoziationen zu Erkrankungen (101, 103, 108) bzw. bestimmten Krankheitsverläufen auf (103, 153).

3.3. Die Katalase, die Glutathionperoxidase 1 und die Hämoxygenase 1

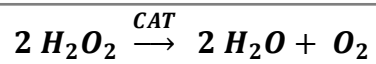
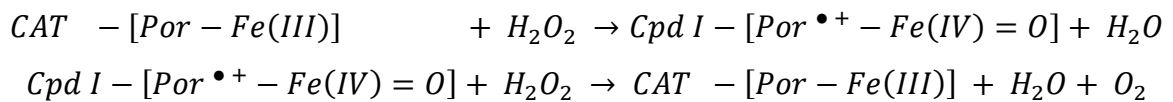
3.3.1 Die Katalase (CAT)

Die bereits lange bekannte Katalase (CAT) (155) dient wie GPX1 dem Abbau von H_2O_2 (55, 136, 156). Diese Reaktion findet sich bei verschiedenen Enzymen, innerhalb derer die CAT zur Gruppe der monofunktionalen oder klassischen Katalasen zählt (44, 157-159).

Ihr Aufbau ist detailliert beschrieben [siehe (158-160)]. In aller Kürze dargestellt handelt es sich um ein Homotetramer (244 kDa beim Menschen) (109, 160), dessen eng miteinander verwobenen Monomere (159, 160) je ein Häm-Molekül (Ferriprotoporphyrin IX), die prosthetische Gruppe, tragen (55, 109, 161, 162). Diese

Häm-Moleküle liegen im Innern des Enzyms, im aktive Zentrum (157-160, 162), welches durch einen trichterförmigen, nur für kleine Moleküle passierbaren (157, 160, 162) Substrattunnel erreichbar ist. Der nicht-essentielle Cofaktor NADPH bindet hingegen auf der Enzymoberfläche (158-160). Die Struktur der CAT resultiert in relativ großer Stabilität (157, 160) und einer der höchsten bekannten Umsatzraten unter den Enzymen (55, 159, 160, 162).

Die typische von der CAT katalysierte Reaktion besteht in der zweiteiligen Dismutation von H₂O₂ zu Wasser und O₂: zunächst wird Häm [Por-Fe(III)] oxidiert, wodurch das Enzym zur Compound I (CpdI-[Por^{•+}-Fe(IV)]) wird, woraus es durch Oxidation von H₂O₂ wieder in den Grundzustand, hierin auch Ferrikatalase genannt, gelangt (44, 55, 157, 158, 162):



Abgesehen von Cpd I, gibt es mit Compound II (CpdII-[Por-Fe(IV)=O/-OH⁺]) und III (CpdIII-[Por-Fe(II)=O₂H⁺]) zwei weitere Zustände der CAT, (44), die jedoch die typische Reaktion nicht katalysieren können (158, 159) und deren Bildung vermutlich durch NADPH vermindert wird (44, 157, 162). Die CAT weist auch geringe Aktivitäten als Peroxidase (55, 109, 161, 162) sowie Oxidase auf (44, 160, 162, 163) und bildet unter der Ultraviolett-B-Strahlung sogar ROS (164, 165).

Die ubiquitäre CAT kommt vor allem in Erythrozyten, der Leber und den Nieren in hohen Konzentrationen vor (55, 109, 160, 163, 166). Auch die Retina, vor allem ihre Ganglienzellen, weisen hohe Konzentrationen der CAT auf (141). Subzellulär findet sie sich vorwiegend in den Peroxisomen und dem Zytosol (57, 109, 163, 166, 167).

Da die CAT zu den konstitutiv exprimierten Genen zu gehören scheint, macht sie dies weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen (163, 168). Dennoch stimulieren der Transkriptionsfaktor *peroxisome proliferator-activator receptor* γ (PPAR γ) (109, 163, 169) und oxidativer Stress (109, 170) ihre Genexpression, während die Langzeitexposition mit H₂O₂ (109, 161), die Proteinkinase B (bzw. Akt), (109, 163, 171), Angiotensin II (über PPAR γ) und verschiedene Zytokine (TNF α , IL-1 β , IFN γ) (109, 110) sowie NO (110) dämpfend auf die Enzymaktivität wirken.

Die CAT gehört zu den zellulären Schutzmechanismen und wirkt als starkes Antioxidans (109, 159, 160, 163, 168). Außerdem mindert sie die Neurodegeneration und hemmt die Apoptose (160, 163). Jedoch führt selbst der weitgehende Verlust der Enzymaktivität (<5%) bei der autosomal-rezessiven Akatalasämie (Morbus Takahara)

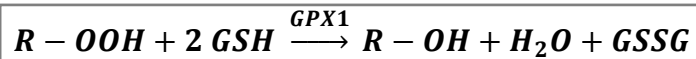
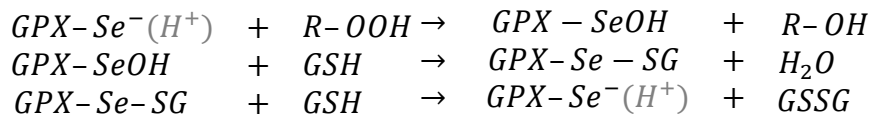
(44) zwar zu Störungen, ist aber durch einen unkomplizierten Verlauf gekennzeichnet (55, 109, 162, 163) .

3.3.2 Die Glutathionperoxidase 1 (GPX1)

Die Glutathionperoxidase 1 (GPX1) ist der Hauptvertreter ihrer Familie, die bei Säugetieren bis zu acht Isoformen umfassen kann (74, 172, 173). Als klassische, zelluläre oder zytosolische GPX (cGPX) ist die GPX1 auch bekannt (93, 111, 173) und setzt ähnlich der CAT (136) H_2O_2 unter Verwendung von Glutathion zu Wasser um (174). Wie diese ist sie ubiquitär vorhanden (74, 82, 94, 175) und findet sich vor allem in Erythrozyten, der Leber sowie den Nieren (156). Auch im Gehirn (90, 176) und der Retina (136, 148) kommt die GPX1 vor, jedoch ist sie in den Gliazellen stärker vertreten, als in den Neuronen (82). Intrazellulär ist die GPX1 im Zytoplasma, aber auch in Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert (74, 90, 175).

Strukturell handelt es sich um ein Homotetramer, dessen Gewicht bei den Säugetieren zwischen 83-95 kDa liegt (74, 111, 172). Eine Besonderheit der GPX1 ist ihre Zugehörigkeit zu den Selenoproteinen (94, 112), deren häufigsten Vertreter sie darstellt (177). Selen, ein essentielles Spurenelement (94), ist als Selenocystein (Sec) über kovalente Bindungen (74, 96, 112) jeweils einmal pro Monomer enthalten (56, 111, 178) Das auf Serin basierende Sec (56, 94) stellt die 21. Aminosäure dar (74) und wird unter speziellen Begleitumständen (74, 82, 94, 96, 112) durch das Stoppcodon TGA bzw. UGA (mRNA) (74, 112) kodiert. Sec befindet sich als Teil der katalytischen Triade ggf. Tetrade im aktiven Zentrum (74, 96, 111, 173) auf der Enzymoberfläche (96, 111). Diese katalytische Triade bzw. Tetrade (74, 94) besteht aus Sec, Tryptophan und Glutamin (74, 96, 112, 178) sowie ggf. Asparagin (94).

Neben H_2O_2 werden auch weitere (niedermolekulare) lösliche Hydroperoxide (R-OOH) von der GPX1 umgesetzt, da dieses Enzym keine große Substratspezifität aufweist (56, 74, 94, 111). Im Kontrast hierzu steht die spezifische Verwendung von Glutathion (GSH) als Cosubstrat (96, 111, 172). Die von der GPX1 katalysierte Reaktion soll am Beispiel von H_2O_2 (R=H) dargestellt werden: Das aktivierte Selen (Se^-) (96, 112, 172) reagiert schnell mit H_2O_2 zu Wasser und einem selenhaltigen Intermediat (74, 94, 172). Das Enzym wird mithilfe von zwei Molekülen GSH unter der Bildung von Glutathiondisulfid (GSSG) wieder in seinen Grundzustand überführt (74, 94, 96, 173). Die Reaktion läuft nach einem Ping-Pong-Mechanismus ohne die Bildung dreiteiliger Komplexe ab (56, 94, 172).



Das gebildete GSSG muss über die Glutathionreduktase mithilfe von NADPH wieder zu GSH reduziert werden, um für die Reaktion erneut zur Verfügung zu stehen (74, 172, 174). Ohne die Abhängigkeit von einem begrenzten GSH- bzw. NADPH-Vorrat lässt sich keine Sättigung der GPX1-Aktivität beobachten (74, 94, 96). CAT und GPX1 bauen beide H₂O₂ ab, jedoch scheint die GPX1 aufgrund ihrer höheren Affinität zu H₂O₂ (55, 90) vorwiegend bei physiologischen H₂O₂-Konzentrationen dessen Abbau zu übernehmen (179), wohingegen der CAT vermutlich vor allem bei höheren Konzentrationen eine wichtige Rolle zufällt (109).

Neben der GSH-Abhängigkeit der GPX1 sind weitere Faktoren in Bezug auf ihre Genexpression und Aktivität zu berücksichtigen. Innerhalb der Selenoproteine gibt es eine Hierarchie für die Verteilung des verfügbaren Selens, in der die GPX1 an unterster Stelle steht (94). Ein Selenmangel führt daher, vermutlich durch den beschleunigten Abbau der mRNA (74, 82, 93), zum Abfall des GPX1-Proteins (177) und ihrer Aktivität (93). Diese Abhängigkeit ist jedoch im Gehirn offenbar weniger stark ausgeprägt (111). Zudem weist der Promotor der GPX1 auch Bindungsstellen für NF-κB und PU.1 auf (74) und Estradiol (74), die SOD1 (136, 176, 179) und cGMP scheinen die Genexpression zu fördern, während Homocystein hemmend wirkt (74, 82, 93).

Die GPX1 dient dem Schutz vor oxidativem Stress (74, 75, 93, 175). Darüber hinaus wirkt sie antiapoptotisch (74, 82) sowie vermutlich antiproliferativ (74) und scheint die Blut-Hirn-Schranke günstig zu beeinflussen (179). Eine Funktion in der Immunabwehr ist denkbar (112), während es widersprüchliche Beobachtungen in Bezug auf ihre Wirkung im Kontext von nitrosativem Stress gibt (74, 75, 82, 177, 178, 180).

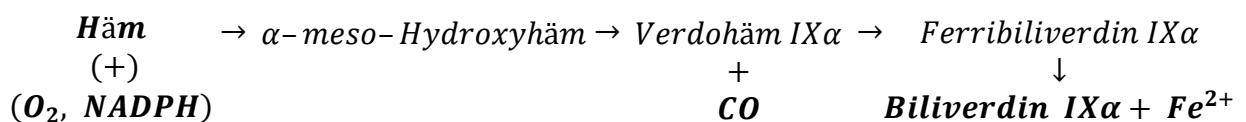
Ein günstiger Einfluss auf kardiovaskuläre, neurodegenerative und maligne Erkrankungen wird vermutet, jedoch geht ihre Überexpression mit einer Insulinresistenz und Adipositas einher (74, 82, 93, 94, 111, 177). Das Fehlen der GPX1 beeinträchtigt die Lebensfähigkeit wenig (93, 111, 112, 156, 172), wenngleich oxidative Schädigungen und die Katarakt (bei Mäusen) begünstigt werden und keine vollständige Kompensation möglich ist (74, 93, 111, 112, 172, 175).

3.3.3 Die Hämoxigenase 1 (HO1)

Die Hämoxigenase 1 (HO1) bzw. das Hitzeschockprotein 32 (HSP32) (95, 181, 182), katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Häm-Abbaus (83, 95, 97, 181, 183). Damit gibt es keine offensichtliche Verbindung zu ROS oder RNS, allerdings scheint das Enzym zu den Hauptmechanismen des (antioxidativen) Zellschutzes zu gehören (62, 63). Bei Säugetieren finden neben der HO1 noch zwei weitere Isoformen (62, 63, 65, 181, 182, 184). Hierzu zählt die HO2, welche konstitutiv (88, 95, 183, 185) und beim retinalen IRI scheinbar unverändert exprimiert wird (83, 87), und die HO3, die eine geringe Aktivität aufweist (181, 186).

Die HO1 ist induzierbar und tritt bei Stressreaktionen in verschiedenen Geweben auf (95, 181). Physiologisch findet man sie in Geweben wie der Milz oder dem retikuloendothelialen System, die mit dem Häm-Abbau assoziiert sind (95, 107, 182). In der gesunden Retina ist die HO1 hingegen kaum oder gar nicht nachweisbar (87, 185), wird indes hier sowie im Gehirn durch entsprechende Stressoren induziert (62-64, 81, 107, 185, 187, 188). Dann scheint sie vorwiegend, aber nicht ausschließlich (63), in den Müllerzellen aufzutreten (87). Die HO1 ist membranständig in den mit dem endoplasmatischen Retikulum (95) assoziierten Mikrosomen (95, 183, 189), möglicherweise aber auch in anderen Zellkompartimenten (95, 107) zu finden.

Die HO1 setzt Häm B (Ferriprotoporphyrin IX α) unter Verbrauch von O₂ und Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH zu Biliverdin IX α , freiem Eisen (Fe²⁺) und Kohlenstoffmonoxid (CO) um (65, 95, 183, 184, 189-191). Dabei ist besonders hervorzuheben, dass es sich um eine substratassistierte Reaktion handelt (189), da das abzubauen Häm auch als katalytischer Cofaktor dient (95, 107, 184). Zudem kommt hier eine Regiospezifität zum Tragen: die Reaktion findet an einer spezifischen Lokalisation des Häms statt, sodass nur α -Isomere des Biliverdins entstehen (95, 184, 189, 190). Die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase stellt die Reduktionsäquivalente bereit (95, 183, 191), während das Häm in retinalen Zellen aus ubiquitären Hämoproteinen beispielsweise durch ROS freigesetzt werden kann (65). Das gebildete Biliverdin kann im Anschluss durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin umgesetzt werden (61, 182).



(95, 182-184, 190, 191)

Die Strukturen der bei Säugetieren ungefähr 32 kDa (61, 95, 183) schweren HO1 ähneln sich bei Nagern und Menschen sehr (95, 184). Die HO1 besteht vorwiegend aus α -helicalen Elementen und umschließt das gebundene Häm größtenteils (183, 189). Die Bindungsstelle scheint durch ihre Konformation eine Hemmung der HO1 durch CO zu vermindern (183, 184, 189) und positive Ladungen auf der Enzymoberfläche begünstigen die Wechselwirkungen mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase sowie der Biliverdinreduktase (95, 183, 184).

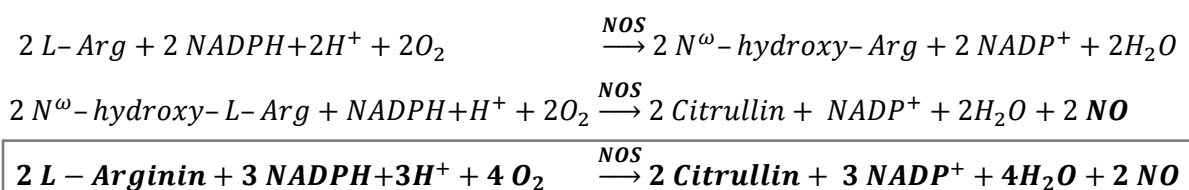
Die Regulation der HO1 findet vorwiegend durch ihre Transkription statt, welche durch eine Vielzahl von stressassoziierten Stimuli induziert werden kann (61, 95, 107, 181, 189). Hierzu zählen neben Häm, Schwermetallen, verschiedenen Zytokinen auch NO, ROS, Hypoxie, Hyperoxie und IRI (63, 64, 83, 87, 88, 95, 107, 181). Ein häufiger gemeinsamer Nenner dieser Stimuli ist oxidativer Stress (61, 62, 185, 186). Für die HO1-Induktion erscheint insbesondere das StRE-Nrf2-Bach1-System wichtig (64, 81, 88, 95): oxidativer Stress und andere Stimuli führen zu einer Freisetzung von Nrf2 [auch NFE2L2, *engl. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (192)] aus dem Nrf2/Keap1-Komplex [Keap1, *engl. Kelch-like ECH-associated protein* (62)] und der Dissoziation des Repressors Bach1 [*engl. BTB domain and CNC homolog 1* (193)] von den StRE oder ARE [*engl. stress-/antioxidant response element* (62)] im Promotor, sodass der Aktivator Nrf2 hier binden kann (61, 62, 64, 95, 182, 194, 195). Ohne Bach1 kommt es unabhängig von Nrf2 zu einer konstitutiven HO1-Expression bei Mäusen (61, 95). Neben der Transkription, auf der das Hauptaugenmerk liegt, kann auch die mRNA-Stabilität beeinflusst werden (61, 95).

Die HO1 wirkt antioxidativ (61, 63, 88, 181, 188, 189, 191), antinitrosativ (65, 83, 95, 181, 182), antiinflammatorisch (61, 64, 65, 87, 88, 97, 167, 181, 182), antiapoptotisch (61, 88, 95, 182) und antiproliferativ (65, 191), wobei diese Effekte vermutlich wenigstens teilweise über ihre Produkte, insbesondere CO und Biliverdin bzw. Bilirubin vermittelt werden (66). Demgegenüber steht das prooxidative (61, 88, 182) und toxische (95, 107) Fe^{2+} , welches indes über verschiedene Wege „entschärft“ werden kann, sodass sich für die HO1 eine protektive Gesamtwirkung ergibt (65, 95).

Bei einem Mangel oder Fehlen der HO1 kommt es, auch beim Menschen (196), zu proinflammatorischen Zuständen (65). Es gibt keine gesicherten Verbindungen zwischen Mutationen und Erkrankungen, allerdings ist der n(GT)-Polymorphismus der HO1 mit zunehmender Anzahl der Wiederholungen durch eine abnehmende HO1-Aktivität und einen ungünstigeren Verlauf bestimmter Erkrankungen gekennzeichnet (61, 62, 88).

3.4. Die Stickstoffmonoxidsynthasen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines Molekül (105, 197) mit großer Bedeutung für die Retina: In ihrem Gefäßsystem ist es als Vasodilatator (198, 199) in die Regulation der Perfusion eingebunden (32, 200), in den Retinaschichten selbst dient es als Neuromodulator bzw. -transmitter (198, 201) und spielt in Form von nitrosativem Stress beim IRI eine Rolle (6, 50). Gebildet wird NO aus L-Arginin (L-Arg) von den Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) (197, 199, 201, 202), von denen bei Säugetieren vorwiegend drei Isoformen bekannt sind (38, 201-205). Es handelt sich bei allen NOS um Homodimere (38, 105) mit Häm als prosthetischer Gruppe (105). Die NOS weisen zwischen den Spezies eine 80-90% Homologie auf (203, 206, 207) und ihre Monomere sind 130 bis 160 kDa schwer (198, 203, 204, 207). Das in den NOS enthaltene Zink ist vorwiegend für die Struktur von Bedeutung (38, 203). Die NOS lassen sich in die konstitutiven Isoformen (cNOS), bestehend aus der neuronalen (nNOS) und endothelialen NOS (eNOS), sowie die induzierbare NOS (iNOS) einteilen (35, 203, 204). Allerdings können auch die cNOS induziert werden (35, 197, 203) und die iNOS eventuell konstitutiv auftreten (203). Diese Einteilung ist dennoch nützlich, da sich diese beiden Gruppen in ihren Calmodulin-Bindungsstellen und im Leistungsvermögen unterscheiden: die iNOS bindet Calmodulin schon bei sehr geringen Calciumkonzentrationen und ist damit weitestgehend calciumunabhängig, wohingegen die Aktivitäten der cNOS calciumabhängig sind (35, 197, 198, 200). Die iNOS hat zudem eine deutlich größere Syntheseleistung, als die cNOS (105, 197). Resultat der NOS-Aktivität ist die NO-Produktion in einer zweiteiligen Reaktion:



Neben dem bereits erwähnten Calcium-(Ca²⁺)-Calmodulin werden zudem Flavinmononukleotid (FMN), FAD, Tetrahydrobioptertin (BH₄) und NADPH sowie Sauerstoff (O₂) als Cofaktoren bzw. -substrate benötigt (24, 105, 203, 206). Neben NO entsteht zudem L-Citrullin (78, 206).

Die Struktur der NOS weist einen C-terminalen Reduktasebereich und einen N-terminalen Oxygenasebereich auf (38, 199, 203). Solange diese Bereiche funktionell gekoppelt sind, entsteht NO (38). Kommt es aufgrund von pathologischen Bedingungen zur Entkopplung (ucNOS, *engl. uncoupling NOS*), entsteht Hyperoxid (O₂^{•-}) anstelle von NO (24, 48, 203, 208). Ein wichtiger Auslöser für diese Entkopplung,

die bei allen Isoformen möglich ist (24, 203), ist ein BH₄-Mangel, welcher als Folge von oxidativem Stress entstehen kann (38, 78, 203, 208). O₂⁻ kann mit NO zu RNS reagieren, die zu Veränderungen von Zellbestandteilen führen (6, 48, 52, 76) und auch zur Entkopplung der NOS beitragen können (209).

NO ist ein unpolares Radikal (181, 210, 211), dessen relativ lange biologische Halbwertszeit von etwa einer Sekunde (31, 210) und gute Diffusionsfähigkeit seine Verteilung im Gewebe erlauben (31, 52, 211). Es kann im Gegensatz zu (anderen) Neurotransmittern (oder -modulatoren) somit nicht in Vesikeln gespeichert werden, sodass seine Konzentration und Wirkung von der Syntheseleistung der NOS abhängen (212). Nach der Synthese kann NO über die Bindung an das Häm-Molekül der löslichen Guanylatzyklase (*sGC*, *engl. soluble guanylyl cyclase*) diese aktivieren und zu einem Anstieg von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führen (38, 78, 198, 213). cGMP dient als Signalmolekül (second messenger) (181, 213) und kann die Proteinkinase G (214, 215), Phosphodiesterasen (215) oder cyclic-nucleotide gated (CNG)-Kanäle beeinflussen (213). Hierüber scheint eine Einflussnahme auf die Genexpression der GPX1 und CAT möglich (74). Die membranständige GC wird in der Retina nicht von NO beeinflusst (35) und die sGC ist in verschiedenen retinalen Zellen von Säugetieren nachgewiesen worden (35, 202). Abgesehen hiervon kann NO auch über eine verstärkte ADP-Ribosylierung von Proteinen wie Transducin wirksam werden (35, 197, 214).

3.4.1 Die neuronale NOS (nNOS)

Die neuronale NOS (nNOS), die auch als NOS I (bzw. NOS 1) (197, 203) oder bNOS (216, 217) bzw. bcNOS (*engl. brain constitutive NOS*) bezeichnet wird (197), tritt in zentralen und peripheren Neuronen (32) und manchen Epithelzelltypen auf (197). In der Retina scheint sie die Hauptquelle der NO-Produktion (218) und vorherrschende Isoform zu sein (213). Sie findet sich vorwiegend zwischen der inneren Körnerzellschicht (*INL*, *engl. inner nuclear layer*) und der Ganglienzellschicht (*GCL*, *engl. ganglion cell layer*) (201, 202, 218). Bezogen auf die hier vorkommenden Zelltypen wurde sie vorwiegend bei verschiedenen Spezies (u.a. Mensch, Ratten, Mäusen) in Amakrinzellen (*AC*, *engl. amacrine cells*) nachgewiesen (35, 37, 202). Diese sind an der interzellulären Kommunikation und der Organisation des rezeptiven Feldes beteiligt (219) und stellen die wichtigste NO-Quelle in der Retina dar (215). AC, deren Somata sich nicht in der INL, sondern in der GCL befinden, werden als sogenannte „verlagerte“ AC (*dAC*, *engl. displaced amacrine cells*) bezeichnet (220).

Bei Ratten machen diese dAC in der GCL etwa die Hälfte der Zellen aus und sind nNOS-haltig (201). Mäuse weisen eine ähnliche nNOS-Verteilung wie Ratten auf (214). Auch bei Mäusen ist ein Anteil von 59% dAC in der GCL festgestellt worden (220), wohingegen es verschiedene Aussagen zum Anteil der dAC in der menschlichen Retina gibt (Vgl. Neufeld (201) und Curcio (221) oder siehe V.2). Auch in den Fotorezeptoren (201, 218), insbesondere unter Stressbedingungen (222, 223), und in den Bipolarzellen (von Ratten und Mäusen) (202) scheint die nNOS aufzutreten. Zudem ist sie auch in perivaskulären Nervenfasern enthalten (224).

Funktionell scheint die nNOS bzw. NO modulierend an der Fototransduktion und den nachgeschalteten Signalkaskaden beteiligt zu sein (35, 202) möglicherweise über die hier beteiligten cGMP-abhängigen Kationenkanäle oder Transducin (35, 225). Zudem scheint ein Einfluss auf die Hell-Dunkel-Adaption (202, 215) und die Gap-Junction-Dichte zwischen Horizontalzellen zu bestehen (202, 217). Auch Wechselwirkungen zwischen Neurotransmittern und NO bestehen (215).

3.4.2 Die induzierbare NOS (iNOS)

Die induzierbare NOS (iNOS) trägt auch die Namen immunologische NOS (35), NOSII (NOS 2), induzierbare Makrophagen-NOS (macNOS) (198) oder (induzierbare) Hepatozyten-NOS (hepNOS) (197). Wenngleich sie zuerst in Makrophagen (78, 197) identifiziert wurde und auch in neutrophilen Granulozyten funktioneller Bestandteil der Immunantwort ist (198, 200, 211), kann sie in fast jedem Zelltyp induziert werden (38, 210). Auch in retinalen und zerebralen Zelltypen (211, 224), vor allem in Müller- (216, 222) und anderen Gliazellen (211, 226, 227), ist sie nachgewiesen worden. Zu ihrem Auftreten in retinalen Pigmentepithelzellen gibt es unterschiedliche Aussagen (211, 226, 228). Zudem können Leukozyten die Retina unter pathologischen Bedingungen wie Entzündungen oder IRI infiltrieren (62, 200, 226), sodass sie als iNOS-Quelle ebenfalls in Frage kommen. Die iNOS-Aktivität weist im Gegensatz zu den cNOS keine Calciumabhängigkeit auf, sondern wird vorwiegend über die Genexpression (78), insbesondere durch die Transkription, reguliert (197, 203), wenngleich auch posttranslational die Stabilität der mRNA beeinflusst werden kann (197). Mögliche Stimuli sind entzündungsassoziierte Zytokine wie TNF α oder IL-1 (14, 38, 227) bzw. die Aktivierung von NF- κ B (105, 197, 199). Aber auch als Folge einer Exposition gegenüber pathologisch hoher Lichtintensität kommt es, möglicherweise aufgrund des oxidativen Stresses oder den daraus resultierenden Gewebsschädigungen (123, 228), zur Induktion der iNOS in der Retina (202, 228). Durch die Abhängigkeit von der

Proteinbiosynthese dauert es bei der iNOS länger als bei den cNOS, bis ein Anstieg der Aktivität bemerkbar wird (105, 198, 229). Sie übertrifft jedoch ihre Isoformen zeitlich und quantitativ weit in ihrer Syntheseleistung (24, 35, 105, 212, 230). Die hierdurch hervorgerufene NO-Produktion ist zytotoxisch (24, 105, 212, 231) und kann direkt (38) bzw. als RNS (228, 231) oder indirekt beispielsweise durch die Hemmung von eisenhaltigen Enzymen (38, 52) zu Zellschädigungen führen. Auch die iNOS selbst kann von NO gehemmt werden (198, 229). Die hohe NO-Produktion dient beispielsweise der Bekämpfung von Infektionen (105, 231), kann aber auch körpereigene Zellen treffen (105, 215). Die iNOS scheint zudem bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und beim ischämischen Apoplex eine Rolle zu spielen (230). Sie ist darüber hinaus auch in die Vermittlung der Glutamatergischen Zytotoxizität eingebunden (83).

3.4.3 Die endotheliale NOS (eNOS)

Die endotheliale NOS (eNOS) ist die dritte Isoform der NOS (NOS III oder 3) bei Säugetieren (32, 204, 212). Sie ist wie die nNOS in ihrer Aktivität calciumabhängig (35, 198, 206), kommt aber im Gegensatz zu ihren Isoformen vorwiegend als membranständiges Enzym vor (78, 197, 198). In ihre zytosolische Form kann sie durch Phosphorylierungen (198), die neben der Calciumabhängigkeit einen Regulationsmechanismus darstellen (78, 197, 203), überführt werden; sie ist dann allerdings inaktiv (198).

Die eNOS ist vor allem in Endothelzellen vertreten (78, 202) und findet sich in der Neuroretina in der Regel nicht (210). Jedoch ist sie aufgrund ihrer Rolle bei der Perfusion und damit der Versorgung der Retina relevant (32, 212). Die Retina verfügt über zwei Gefäßsysteme (choroidales und retinales System), die beide der Arteria ophthalmica entspringen (32). Bei Nagern ist das choroidale System für die Versorgung vorrangig, wohingegen bei Primaten auch das retinale System, das nicht durch das vegetative Nervensystem beeinflusst wird, wichtig ist (32). Unter den kleinen Versuchstieren entspricht zwar der Perfusionstyp bei Ratten am ehesten der Versorgung beim Menschen (14), allerdings handelt es sich auch beim Mausmodell um eine etablierte und häufig genutzte Methode für Untersuchungen von IR-Geschehen in der Retina (4, 13, 51, 148, 232, 233). Die Perfusion der Retina erfolgt bedarfsorientiert bzw. (weitgehend) unbeeinflusst vom systemischen Blutdruck mithilfe einer Autoregulation (32, 35, 212). NO ist ein Faktor, der neben Eicosanoiden, Laktat und weiteren Elementen hierin eine Rolle spielt (32); es scheint insbesondere für den

basalen Gefäßtonus verantwortlich zu sein (212). Zwischen den verschiedenen Substanzen bestehen Wechselwirkungen, wie eine mögliche gegenseitige Verstärkung der Prostaglandin- und NO-Produktion (32, 234). Neben seiner vasodilatatorischen Wirkung (199, 212, 234), welche NO über den sGC-cGMP-Signalweg vermittelt (65, 206), hemmt es zudem die Thrombozytenaggregation sowie die Leukozytenadhäsion (199, 200, 212) und kann O_2^- eliminieren (52, 77). Auch die nNOS (aus perivaskulären Nervenfasern) beeinflusst die Perfusion (212), allerdings stellt die eNOS die Hauptquelle für das im Gefäßsystem wirksame NO dar (48).

4. Betulinsäure

Die Betulinsäure [3β -Hydroxy-lup-20(29)-en-28-säure (67, 235-240), $C_{30}H_{48}O_3$ (241); BA, engl. *betulinic acid*] ist ein pentazyklisches Triterpenoid (235, 237, 238, 240, 242-244) mit pflanzlichem Ursprung (236-238, 242, 243, 245), das zur Gruppe der Lupane (235, 237, 241, 243, 244) zählt. In der Flora ist sie weit verbreitet (236, 241, 243, 246-248) und kann vor allem aus Bestandteilen von Birkengewächsen (Betulaceae) (235, 237, 243, 245, 249, 250) oder Kreuzdorngewächsen (Rhamnaceae) (235, 245, 248, 251) aber auch Myrten- (Mytenaceae), Ebenholz- (Ebenaceae) oder Pfingstrosengewächsen (Paeoniaceae) (235, 237, 243, 247) extrahiert werden. Vor allem in Blättern, Fruchtschalen oder der Rinde dieser Pflanzen findet sich BA (48, 252, 253). So enthält die äußere Rinde der *Betula alba* (Hängebirke) 2-3% Betulinsäure (bezogen auf das Trockengewicht) (241, 244, 254). In weitaus größeren Mengen kann mit einem Anteil von bis zu 35% Betulin (235, 244, 250, 254-257), das Substrat für die BA-Synthese, gewonnen werden. Der Gewinn bei der Oxidation von Betulin zu BA (238, 247, 257) beträgt bis zu 85% (244, 255) und kann mit verschiedenen Verfahren erzielt werden (235).

BA-haltige Pflanzenbestandteile werden in der traditionellen Medizin beispielsweise in Russland (244, 250) Amerika (236, 244, 246, 250) und China (208, 209, 252) verwendet. Birkenrinde findet Anwendung bei gastrointestinalen (235, 244, 258) oder dysurischen (250, 259) Krankheitsbildern, während die getrockneten Samen (*Zizyphus spinosi semen* bzw. Suan Zao Ren) der Chinesischen Dattel (*Zizyphus jujuba*) bei kardialen Arrhythmien (208, 260) und Unruhezuständen (209, 260) eingesetzt werden. Natürlich enthalten diese pflanzlichen Verbindungen jedoch neben BA noch weitere bioaktive Substanzen (208, 261).

Die steigende Anzahl der BA-bezogenen Publikationen in den vergangenen zwanzig Jahren zeigen ein wachsendes Interesse der evidenzbasierten Medizin, seit in der

Mitte der 1990er Jahre erstmals über die hemmende bzw. zytotoxische Wirkung der BA gegenüber Tumorzellen (Melanom) (262) und dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) (263) berichtet wurde. Inzwischen sind neben der selektiven antitumorösen Wirkung auf verschiedene Tumore und Zelllinien (235-238, 241, 243, 255) auch antikanzerogene (238, 247), antioxidative (238, 239, 246, 248, 251, 257, 264, 265), antientzündliche (235, 237-239, 242-244, 246, 254, 255, 264), antiangiogenetische (241, 242, 257, 266), hepato- (238, 241, 257) und neuroprotektive (235, 241, 251) sowie immunmodulatorische (98, 241, 249, 265) Eigenschaften von BA bekannt. Gegen bestimmten Infektionserreger neben HIV (235, 237, 238, 240, 241, 243, 255) scheint sie darüber hinaus ebenfalls eine Wirkung aufzuweisen [Malaria (235, 237, 238, 241, 244, 255), humanes Herpes-Virus-1 (237, 243, 250, 255), Helminthiasis (235, 237, 238, 250), Mykosen (237, 254, 255), Bakterien (235, 237, 244, 267)].

Außerdem scheinen unter BA Stoffwechseleffekte aufzutreten, die sich günstig auf einen Diabetes mellitus Typ 2 und verwandte Entitäten auswirken (243, 265).

Zu den chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der BA gibt es von Khan et al. (237) eine aktuelle computergestützte Analyse. Diese sagt für BA eine hohe Lipophilie ohne relevante Wasserlöslichkeit voraus. Die berechnete humane intestinale Absorption (95,996%) und Plasmaproteinbindung (100%) sind groß. Zudem sollte die Passage der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls gut möglich sein, sodass eine gute zentrale Aktivität erwartet wird. Eine Hemmung von CYP2C9 und CYP3A4 sowie ein Abbau über CYP3A4 werden aufgrund der Berechnungen vermutet (237). Die Lipophilie und schlechte Wasserlöslichkeit von BA sind bestätigt (242, 255, 256, 268).

In vivo wurde eine rasche Absorption bei CD1-Mäusen aus dem Peritonealraum (Maximalkonzentration nach ca. 9 min bzw. 14 min) (256) und bei Sprague-Dawley Ratten nach oraler Gabe beobachtet (Maximalkonzentration nach ca. 60min) (258), die für eine gute Absorption sprechen (254). Die hohe Plasmaproteinbindung von BA ($\geq 99,7\%$) ist bei verschiedenen Spezies, darunter auch Mäuse, ab Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen (245, 268) und eine Überquerung der Blut-Hirn-Schranke beobachtet worden (254, 256). Es kommt zu einer Akkumulation im Fettgewebe (256). Die erwartete Interaktion von BA mit CYP2C9 und CYP3A4 und einem möglichen Abbau von BA hierüber wurde in vitro ohne eindeutiges Ergebnis untersucht (243, 268). In hepatischen Mikrosomen scheint ein Abbau von BA stattzufinden (268).

Bezüglich der pharmakotkinetischen Daten sind die berechneten Erwartungswerte vielversprechend, auch wenn In-vivo-Daten nur bruchstückhaft vorliegen. Dieses Manko kann teilweise dadurch ausgeglichen werden, dass experimentelle Tierstudien

signifikante Veränderungen durch die orale Gabe der BA feststellen konnten. Hierauf basierend kann trotz noch unvollständiger Kenntnisse der Pharmakokinetik davon ausgegangen werden, dass bei den verwendeten Dosen von 50 (253, 269) bzw. 200 mg/kg Körpergewicht (251) per os eine ausreichende Bioverfügbarkeit im Gehirn vorliegt. Peripher liegen die verwendeten Dosen, die zu signifikanten Veränderungen führen, zwischen 1 – 50 mg/kg Körpergewicht (239, 248, 257, 264, 265, 270, 271) per os (248, 257, 265, 271) oder intraperitoneal (264, 270).

III. Material und Methoden

Die im Folgenden dargestellten Versuche repräsentieren eines der drei Teilprojekte des Forschungsvorhabens „Einfluss von Antioxidantien auf die Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens in der Retina“ (ISCHREP2013) an der Augenklinik der Universitätsmedizin Mainz. Die Tierversuche wurden am 17.10.2013 durch das Landesuntersuchungsamt Referat 23 (Tierseuchenbekämpfung, Tierschutz, tierische Nebenprodukte) in Koblenz genehmigt (Antragsnummer: 23 177-07/G 13-1-064). Die Richtlinien 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates sind während der Durchführung der Versuche im Februar und März 2014 und August 2016 erfüllt worden. Abbildung I bietet einen Überblick über das Prozedere.

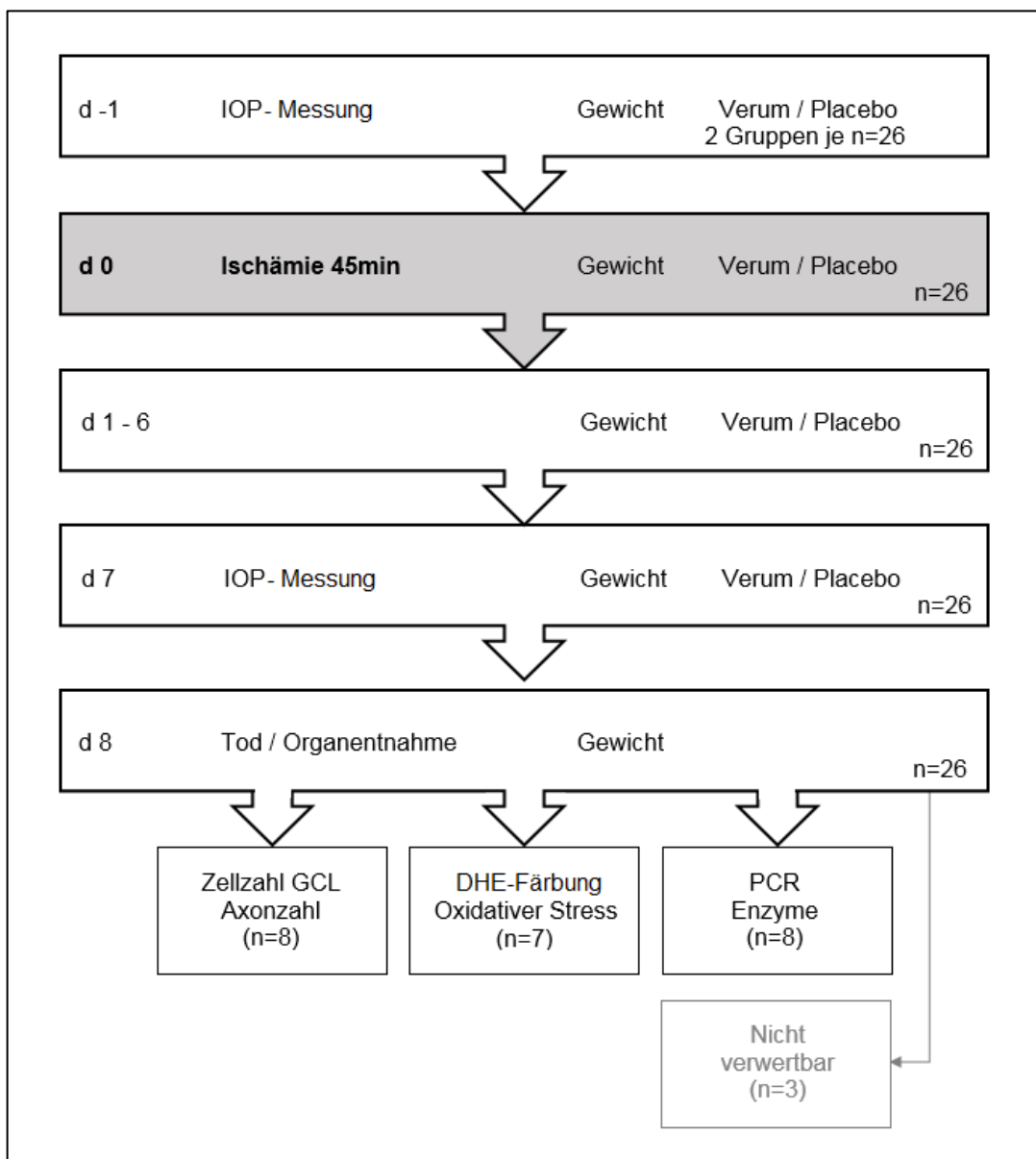


Abbildung I: Überblick über den Versuchsablauf von Tag -1 (d -1) bis Tag 8 (d8), IOP (Intraokularerdruck), Gewicht (Messung), n (Stichprobengröße), GCL (Ganglienzellschicht, DHE (Dihydroethidium), PCR (Polymerasekettenreaktion)

Material (Bezeichnung)	Hersteller
Betulinsäure (3β-Hydroxy-lup20(29)-en-28-säure; C ₃₀ H ₄₈ O ₃)	BioSolutions Halle GmbH, Halle (Saale), Deutschland
Deckgläser Menzel-Glas	Gerhard Menzel GmbH, Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Dihydroethidium (Hydroethidin, C ₂₁ H ₂₁ N ₃)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad (Kalifornien), USA
Dimethylbenzen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylschwefeloxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diskus-Software	Carl H. Hilgers, Königswinter, Deutschland
Fixiermittel Eukitt®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Floxal® 3mg/g (Ofloxacin-Augensalbe)	Bausch & Lomb, Rochester (New York), USA
Glasröhren (Custum Glas Tubing)	Drummond Scientific Company, Broomall (Pennsylvania), USA
Glutaraldehyd-Lösung 2,5%	Fluka Chemika, Sigma-Aldrich, Saint Louis (Missouri), USA
GraphPad PRISM 6	Graphpad Software Inc., La Jolla (San Diego), California, USA
Haushaltswaage EasyHome	Globaltronics GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City (Kalifornien), USA
IBM SPSS Statistics (SPSS 23 V5)	International Business Machine (IBM) Corporation, Armonk (New York), USA
CFX Connect Real-Time System 185-5200	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
ImageJ (Fiji 32bit)	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA (http://rsb.info.nih.gov/ij)
Inkubationsschrank VWR® INCU-Line	VWR International GmbH, Radnor (Pennsylvania), USA
inverses Fluoreszenzstereomikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon Corporation, Chiyoda (Tokio), Japan
Kamera mit CCD-Sensor (charge-coupled device)	Hitachi, Chiyoda (Tokio), Japan
Kanüle Venofix Safety 23G	B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Ketamin-hameln 50mg/ml	hameln pharma plus gmbh, Hameln, Deutschland
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Kresylblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kryoeinbettformen TissueTek® Cryomold®	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Kryostat CM1850	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Premium (4°C)	Liebherr-International AG S.A., Bulle (Freiburg), Schweiz
Mikro-Federschere	Geuder AG, Heidelberg, Deutschland
Mikropipette Eppendorf Research plus (100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Mikropipette H63776 4500 (10-100µl)	Thermo LabSystems Inc., Beverly (Massachusetts), USA
Mikroskopkamera Nikon DS-Fi1	Nikon Corporation, Chiyoda (Tokio), Japan
Mikrotomklingen (Feather® Microtome Blades A35)	Feather® Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
NaCl - Lösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Nikon Intensilight C-HGFI	Nikon Corporation, Chiyoda (Tokio), Japan
NIS - Elements Basic Research	Nikon Corporation, Chiyoda (Tokio), Japan
Objektträger SuperFrost® Plus™,	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Operationsmikroskop	Carl Zeiss Meditec, Jena, Deutschland
Paraformaldehyd 4%	Sigma-Aldrich, Saint Louis (Missouri), USA
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Phosphatgepufferte Lösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, Saint Louis (Missouri), USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard (2-200µl und 50-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenzieher Vertical Pipette Puller 700C	David Kopf Instruments, Tujunga, (California) USA
Reaktionsgefäßen (Eppendorf Safe Lock, 2,0 ml, ambra)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reboundtonometer Icare® TonoLab	Icare Finland OY, Vantaa, Finnland
Schlundsonde 18G (Artikelnummer 18061-50)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
StepOnePlus™ - Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City (Kalifornien), USA
SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™	Sigma-Aldrich, Saint Louis (Missouri), USA
Tiefkühlschrank Liebherr profiline (-20°C)	Liebherr-International AG S.A., Bulle (Freiburg), Schweiz
TissueTek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Ultramikrotom Ultracut E	Leica, Bensheim, Deutschland
Ultratiefkühlschrank Thermo Scientific™ HERAfreeze™ (-80°C)	Thermo Scientific Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Vanox-T-Mikroskops	Olympus, Hamburg, Deutschland
Xylazin	Sigma-Aldrich, Saint Louis (Missouri), USA

1. Intervention: Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI)

1.1 Vorbereitende Maßnahmen

Es wurden männliche Wildtypmäuse (C57BL/6J) im Alter von sechs Monaten aus der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz verwendet. An diesem Stamm sind die Erzeugung von und Einflussnahme auf einen IRI bereits beschrieben worden (12, 141, 148). In der Literatur finden sich aber auch Untersuchungen an andere Mausstämmen (113, 272, 273) oder Ratten (274-276).

Am Vortag (d -1) der ischämischen Intervention wurde bei den Tieren nach zufälliger Verteilung auf die Verum- und Placebogruppe der Ausgangszustand durch die Inspektion, Erfassung des Körpergewichts und des Intraokularsdrucks (IOP) erhoben, um gegebenenfalls erkrankte Tiere oder Tiere mit einer vorbestehenden IOP-Erhöhung auszuschließen. Zur Schätzung des IOPs wurden mit dem Reboundtonometer Icare® TonoLab (Icare® Finland OY, Vantaa, Finnland) pro Auge mindestens sechs Messungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt. Die tägliche Gewichtsmessung dient sowohl der Kontrolle des Gewichtsverlaufs, als auch der Anpassung der gewichtsadaptierten Dosis von Verum oder Placebo. Hierfür wurde eine handelsübliche digitale Haushaltswaage (EasyHome, Globaltronics GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) benutzt.

1.2 Darreichungsform und Dosierung von Betulinsäure und Placebo

Die verwendete Betulinsäure (BA) (BioSolutions Halle GmbH, Halle (Saale), Deutschland) wies einen Reinheitsgrad von >97% auf und wurde mit einer Konzentration von 20mg/ml in Dimethylschwefeloxid (DMSO; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und aliquotiert bei -20°C aufbewahrt.

Direkt vor der Verabreichung ergab sich durch die Zugabe desselben Volumens von phosphatgepufferter Lösung (PBS; Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) die gewünschte BA-Konzentration von 10mg/ml. In einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (KGW) wurde das BA-Präparat den Tieren einmal täglich zugeführt.

Die Placebogruppe erhielt ebenfalls täglich eine jeweils frisch hergestellte Lösung aus gleichen Teilen Dimethylschwefeloxid (DMSO; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und phosphatgepufferter Lösung (PBS; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) in der Dosierung von 5µl/g KGW. Hierdurch wurden in der Placebogruppe gewichtsadaptiert die gleichen Mengen der Trägersubstanzen (DMSO, PBS) zugeführt, welche in der Verumgruppe in der entsprechenden Dosis des BA-Präparats enthalten waren.

Bei DMSO handelt es sich um ein gebräuchliches Lösungsmittel für Betulinsäure (252, 253, 269). Auch die Senkung des DMSO-Anteils durch die Zugabe von gepufferten Lösungen ist beschrieben worden (252, 254).

In beiden Gruppen wurden die Substanzen über eine 18G-Schlundsonde (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland) intragastral verabreicht, sodass die perorale Aufnahme imitiert wurde. Somit war eine kontrollierte Zufuhr der Substanzen in beiden Gruppen gewährleistet und die Dosen in den Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Trägersubstanzen.

Die Tiere erhielten ab dem Vortag (d-1) bis sieben Tage nach der IRI-Induktion (d7) einmal täglich das Verum bzw. das Placebo. Insgesamt wurden die Substanzen demnach über neun Tage zugeführt.

1.3 Erzeugung der Ischämie

Es gibt verschiedene Modelle zur Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens in der Retina (14). Meist wird sich hierbei eine Erhöhung des Intraokular drucks (IOP) (4, 170, 200, 277) oder eine Unterbrechung der Perfusion über die Ligatur der zuführenden Gefäße (136, 216, 226) zunutze gemacht. Nach Erreichen der gewünschten Ischämiedauer kann die Ligatur entfernt beziehungsweise ein Rückgang des IOP auf das Ausgangsniveau ermöglicht werden. Somit kommt es zum Wiedereinsetzen der Perfusion und Entstehung eines kombinierten Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI). In diesem Experiment wurde ein IRI mithilfe eines erhöhten Intraokular drucks in Narkose herbeigeführt.

1.3.1 Narkose

Für die Narkose wurde eine Kombination von Ketamin (Ketamin-hameln 50mg/ml, hameln pharma plus gmbh, Hameln, Deutschland) und Xylazin (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) verwendet. Die verwendete Lösung enthielt die Substanzen in den Konzentrationen von 1 mg/ml Xylazin und 10 mg/ml Ketamin in 0,9% NaCl-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Diese Kombination stellt eine gängige Narkoseform für Mäuse, auch für die Untersuchung des retinalen (12, 187, 278, 279) oder zerebralen (100, 280) IRI, dar.

Die Tiere erhielten die Ketamin-Xylazin-Kombination in der gewichtsadaptierten Dosierung von 100 mg/kg KGW Ketamin und 10 mg/kg KGW Xylazin entsprechend einem Volumen von 10 ml/kg (μ l/g) intraperitoneal zur Narkoseeinleitung. Nach der Injektion wurde das Ende der Spontanbewegungen des Tieres abgewartet und der

Wirkungseintritt über den Konjunktivalreflex überprüft. Hiernach erfolgte die Platzierung des Tieres unter Berücksichtigung wärmeerhaltender Maßnahmen unter dem Operationsmikroskop (Carl Zeiss Meditec, Jena, Deutschland) platziert. Über eine intraperitoneal platzierte 23G-Kanüle (Venofix Safety, B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) bestand die Möglichkeit einer Nachinjektion der zur Einleitung genutzten Ketamin-Xylazin-Kombination ohne Manipulation am Tier während des laufenden Experiments. Im Falle von Anzeichen für eine zu flache Narkose wurden Nachinjektionen von 0,05 ml entsprechend einer Dosis von 50 µg Xylazin und 500 µg Ketamin bedarfsadaptiert verabreicht.

1.3.2 Erhöhung des Intraokularsdrucks (IOP)

Mithilfe einer Glaskanüle [aus Glasröhren (Drummond Scientific Company, Broomall, Pennsylvania, USA) mit dem Pipettenzieher Vertical Pipette Puller 700C (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) hergestellt] wurde die Cornea unter dem Operationsmikroskop (Carl Zeiss Meditec, Jena, Deutschland) perforiert. Hierdurch wurde die Vorderkammer des Auges mit dem sterilen Inhalt einer angeschlossenen 0,9% NaCl-Infusion (B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) verbunden. Dieser Vorgang wurde an beiden Augen durchgeführt. Die entsprechenden Infusionsflaschen befanden sich allerdings auf verschiedenen Höhen, sodass unterschiedliche hydrostatische Drücke über die Wassersäulen in den Augen entstanden. Die Infusionsflasche 149,5 cm oberhalb des Tieres erzeugte einen IOP von 110 mmHg. Dies überschreitet den okularen Perfusionsdruck (12, 14)¹ und führt zu einer Ischämie der Retina. Die zweite Infusionsflasche erhielt über die Wassersäule von 20,4 cm in dem anderen Auge einen physiologischen² IOP von 15 mmHg aufrecht (281). Somit entstanden ein „Hochdruckauge“ (HP-Auge, 110mmHg) mit einer ischämischen Retina und ein „Normaldruckauge“ (NP-Auge, 15mmHg), das als Kontrolle diente (siehe Abbildung II). Die Erhöhung des IOPs im HP-Auge wurde durch die Bulbusschwellung beim Öffnen der Rollklemme sichtbar. Zudem wurden die IOP-Werte stichprobenartig mittels Reboundtonometer Icare[®] TonoLab (Icare Finland OY, Vantaa (zuvor Espoo), Finnland) kontrolliert. Durch das Operationsmikroskop konnten

¹ Unter der Annahme, dass der okulare Perfusionsdruck bei Mäusen maximal dem systolischen Blutdruck (≤ 120 mmHg) abzüglich des IOPs (siehe Fußnote 2) entsprechen kann.

² Bei der Studie von Qiu wurde bei C57BL/6J Mäusen nach zweiminütiger Einwirkzeit einer Ketamin-Xylazin-Kombination ein IOP gemessen, der im Mittel zwischen 14,9-19,7mmHg liegt (Mittelwert+/- Standardabweichung). Da die verwendeten Narkotika den IOP signifikant steigern, wurde der untere Bereich der Skala als physiologischer IOP gewählt.

gegebenenfalls entstehende Vorderkammerblutungen oder Leckagen an der Punktionsstelle registriert werden.

Die gewählte Ischämiedauer von 45 min liegt oberhalb der geschätzten Ischämietoleranzzeit der Mausretina von 30 min (14). Nach dem Ablauf dieser Zeit wurden die Kanülen bei geöffneter Rollklemme wieder entfernt und zur Infektionsprophylaxe Ofloxacin-Augensalbe 3mg/g (FloXal®, Bausch & Lomb, Rochester, New York, USA) auf beide Corneae aufgetragen. Das Tier wurde bis zum vollständigen Erlöschen der narkotischen Wirkung in einen Einzelkäfig verbracht.

Ähnliche Vorgehensweisen finden sich auch bei anderen Arbeitsgruppen (12, 13, 87, 99, 282, 283). Wenngleich diese natürlich Variationen bezüglich der exakten Dauer der Ischämie, der verwendeten Tiere, der Narkotika oder Geräte aufweisen, bleibt das Grundprinzip erhalten.

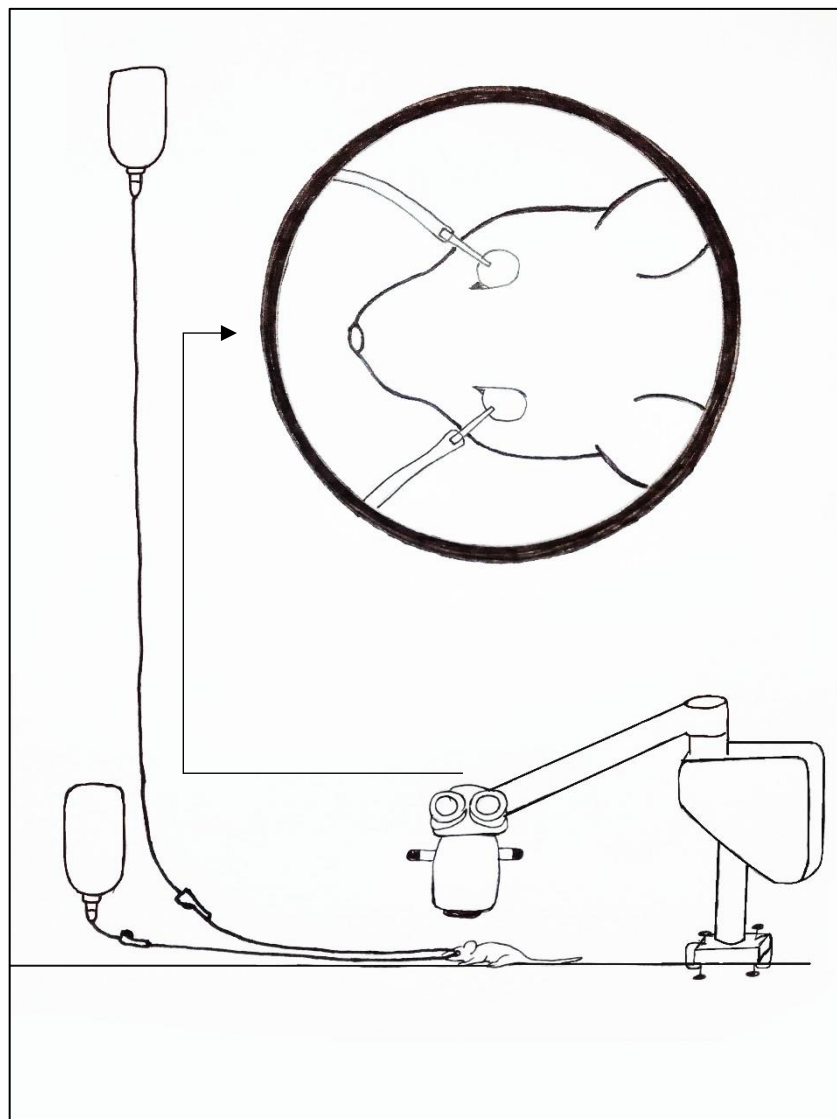


Abbildung II: Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus zur Ischämieinduktion, ohne Darstellung wärmeerhaltender Maßnahmen u.ä.

1.4 Abschließende Maßnahmen

Über den verbleibenden Zeitraum von acht Tagen (d1-8), an denen die Tiere täglich gewogen wurden (d1-8) und entsprechend ihrer Gruppe gewichtsadaptierte Dosen von BA oder Placebo erhielten (d1-7), hatten sie freien Zugang zu frischem Wasser und Pelletnahrung. Sie wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren gehalten, wobei nur Tiere aus einer Gruppe (Betulinsäure / Trägersubstanzen) einen Käfig teilten, um eine Kontamination auszuschließen. An Tag 7 (d7) wurde der IOP wie zuvor beschrieben ermittelt und somit die sekundäre dauerhafte IOP - Erhöhung ausgeschlossen. Durch eine CO₂-Inhalation wurde an Tag 8 (d8) der Tod der Tiere vor der E nukleation herbeigeführt. Die CO₂-Inhalation mit schrittweiser Erhöhung der CO₂-Konzentrationen gehört zu den adäquaten Tötungsverfahren von Nagetieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach den Bestimmungen der europäischen Tierschutzverordnung (Vgl. TierSchVersV vom 1. August 2013, Anlage 2 zu §2 Absatz 2).

1.5 E nukleation

Nach Eintreten des Todes durch CO₂-Inhalation wurde die E nukleation unter dem Stereomikroskop durchgeführt. Nach der Dekapitation mit einer Schere wurden die Lidspalten nach lateral und medial erweitert. Es folgte die stumpfe Präparation unter Zuhilfenahme der geschlossenen Branchen einer Mikro-Federschere (Geuder AG, Heidelberg, Deutschland) zur Dissektion des Bulbus von Augenmuskeln und Bindegewebe. Nach der Mobilisierung desselben wurde der N. opticus durchtrennt. Dabei wurde insbesondere in der Auswertungsgruppe I darauf geachtet, den N. opticus möglichst lang abzusetzen. Der Bulbus wurde aus der Orbita gehoben und je nach zugehöriger Analysemethode weiter behandelt (siehe III.2.2.1 Herstellung von Flachpräparaten, III.2.3.1, III.2.4.1).

2. Analytische Methoden

Die analytischen Methoden umfassen die Kresylblau-Färbung der Flachpräparate zur Erfassung der Neuronenanzahl in der Ganglienzellschicht (GCL), die Toluidinblau-Färbung der Sehnervenquerschnitte zur Ermittlung der Axonzahl, die Färbung von Kryoschnitten mit Dihydroethidhin (DHE) als Parameter für den oxidativen Stress und die quantitative Polymeraseketterreaktion (RT - qPCR) zur Analyse der mRNA-Level.

2.1 Gruppeneinteilung

Insgesamt umfasst dieses Experiment 52 Tiere, die gleichmäßig auf zwei Gruppen verteilt Betulinsäure ($n_{BA} = 26$) oder die Trägersubstanzen (Placebo) ($n_{Plc} = 26$) erhielten. Aufgrund von Drop-outs gehen 46 Tiere ($n_{BA/Plc}=23$) in die drei Auswertungsgruppen ein. Jedes Tier stellt ein HP- und ein NP-Auge dar, sodass sich in jeder Auswertungsgruppe vier Untergruppen aus den Kombinationen BA – HP/NP und Plc – HP/NP ergeben. Diese werden im Folgenden nicht einzeln aufgeführt:

- | | | |
|------|--|---|
| I. | 1. Kresylblau-Färbung (Flachpräparate; Neurone in GCL)
$n_{BA} = 8; n_{Plc} = 8$ (nur <i>Retina</i>) | } Insgesamt:
$n_{BA} = 8; n_{Plc} = 8$ |
| | 2. Toluidinblau-Färbung (Axonzahl im N. opticus)
$n_{BA} = 8; n_{Plc} = 8$ (<i>N. opticus</i>) | |
| II. | Dihydroethidin-Färbung (oxidativer Stress)
<i>gesamt: $n_{BA} = 7; n_{Plc} = 7$</i> | |
| III. | Quantitative PCR (mRNA, Genexpression)
<i>gesamt: $n_{BA} = 8; n_{Plc} = 8$</i> | |

2.2 Methoden zur Erfassung der Anzahl von Neuronen in der retinalen

Ganglienzellschicht (GCL)

2.2.1 Herstellung von Flachpräparaten

Es sind verschiedene, sich ähnelnde Methoden zur Anfertigung von Flachpräparaten (auch Flat mounts oder Wholemounds genannt) beschrieben (284-286). Nach der Fixierung in 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) für eine Stunde wurden die Bulbi in phosphatgepufferter Lösung (PBS; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) gewaschen und bis zur zeitnahen Präparation bei 4°C in PBS gelagert. Auch die Präparation selbst fand in PBS statt. Dies verhindert eine Beschädigung des Gewebes durch Austrocknung. Der Sehnerv war zugfrei nach der Enukleation und vor der Fixierung abgesetzt und in 2,5% Glutaraldehyd-Lösung (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) überführt worden, da er für die

Bestimmung der Axonzahl im N. opticus genutzt werden würde (siehe III.2.3 Ermittlung der Axonanzahl im Nervus opticus).

Die Präparation fand unter dem Stereomikroskop statt und begann mit der Entfernung von gegebenenfalls noch vorhandenen Resten der äußeren Augenmuskeln oder des Bindegewebes. Anschließend wurde der Bulbus durch eine zirkuläre Präparation entlang des Limbus zunächst eröffnet und von der Cornea getrennt. Die Linse wurde entfernt und vier Einschnitte orthogonal zur Präparationsfläche in Richtung der Papille angebracht. Überschüssiges Gewebe wurde entfernt und die vier Quadranten der Retina wurden kreuzförmig ausgebreitet (siehe untenstehende Abbildung III).

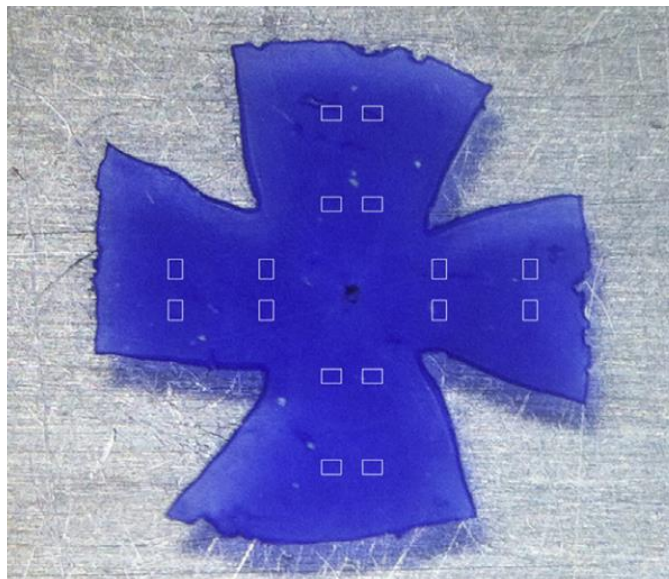


Abbildung III: Makroskopische Ansicht eines Flachpräparats, Markierung der vordefinierten Bereiche für die Photographien (1)

2.2.2 Kresylblau-Färbung

Die Nissl-Färbung gehört zu den etablierten Übersichtsfärbungen in der Neuroanatomie und findet dementsprechend auch Anwendung bei der Darstellung der retinalen GCL (287, 288). Es können verschiedene basische Farbstoffe (289) wie Kresylviolett (121, 289) oder Methylenblau (284, 288) eingesetzt werden. In dieser Untersuchung fand Kresylblau Verwendung:

Die vorbereiteten Flachpräparate wurden zunächst in PBS gewaschen. Nach der Dehydrierung und anschließender Rehydrierung durch an- und wieder absteigenden Ethanolkonzentrationen zwischen 70 – 100% erfolgte die Überführung in destilliertes Wasser zur Waschung. Anschließend fand die Färbung mit 2% Kresylblau (Merck, Darmstadt, Deutschland) statt. Hieran schloß sich die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs und Dehydratisierung in Ethansäure (Eisessig) und 70% Ethanol an. Nach

der Inkubation in Xylol bzw. Dimethylbenzen (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die gefärbten Flachpräparate mit schnell härtendem Fixiermittel (Eukitt®, Merck, Darmstadt, Deutschland) auf Objektträgern aufgebracht und mit Deckgläsern abgeschlossen.

Kresylblau ist ein organischer Farbstoff, der bei neutralen pH-Werten als Kation vorliegt (290, 291) und sich an DNA (291), RNA und Ribosomen (292) anlagert. Hierüber werden Strukturen im Zellkern violett bis blau angefärbt (292), aber auch die Nissl-Substanz sichtbar: Die Nissl-Substanz stellt das mRNA-haltige raue endoplasmatische Retikulum dar (293) und führt zur Darstellung der Somata. In Axonen ist der Gehalt der Nissl-Substanz zu gering, sodass diese nicht dargestellt werden (294). Die morphologische Unterscheidung der Zellen ist jedoch anhand der Somata möglich (siehe III.2.2.3). Die Herstellung von Flachpräparaten und nachfolgende Färbung fanden in Zusammenarbeit mit *-aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt-* (Augenklinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz) statt.

2.2.3 Bildgewinnung und -analyse (Zellzählung)

Unter Verwendung eines Vanox-T-Mikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) und angeschlossener Digitalkamera mit CCD-Sensor (charge-coupled device) (Hitachi, Chiyoda, Tokio, Japan) und unter Zuhilfenahme der Diskus-Software (Carl H. Hilgers, Königswinter, Deutschland) wurden pro Flachpräparat 16 Aufnahmen, je vier pro Quadranten gemacht. Davon stammen je zwei Aufnahmen aus dem zentralen (proximaler Bildrand 0,75 mm Zentrum der Papille entfernt) und zwei Aufnahmen aus dem peripheren (1,65 mm vom Zentrum der Papille gelegen) Bereichen (siehe auch Abbildung III).

Die Analyse der Bilder, also die Zählung der Zellen wurde verblindet mithilfe der Zellzählungsfunktion des Open Source-Programms ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA [<http://rsb.info.nih.gov/ij>]) durchgeführt.

Dabei ist eine morphologische Unterscheidung zwischen Neuronen, Gliazellen und Endothelzellen und somit die Zählung der Neurone möglich (284). Als Neurone werden Zellen ab einem Durchmesser von 8 µm, mit starker Nissl-Färbung, prominentem Nucleolus und irregulären Ausläufern erkannt. Gliazellen hingegen haben einen Durchmesser unterhalb von 8 µm und eine gleichmäßige, rundliche Außenkontur. Endothelzellen stellen sich als längliche Zellen dar (1, 284). In Abbildung IV sind einzelne Beispiele der genannten Zelltypen in einem Ausschnitt der mikroskopischen Ansicht markiert.

Auf der Basis dieser morphologischen Unterteilung ist jedoch eine Differenzierung zwischen retinalen Ganglienzellen und anderen Neuronen, wie Amakrinzellen nicht möglich (284).

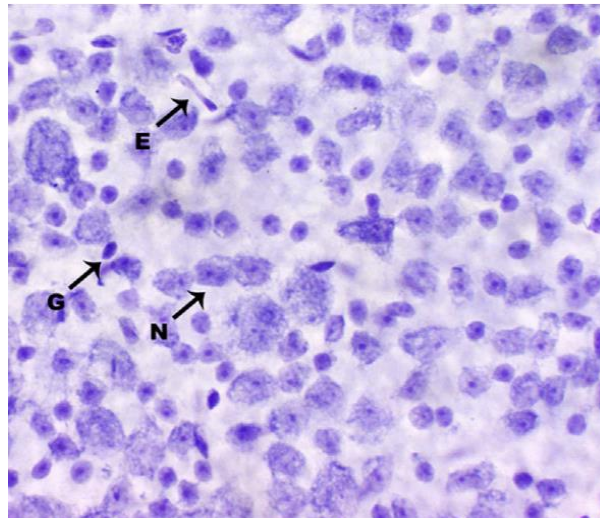


Abbildung IV: Mikroskopische Ansicht eines retinalen Flachpräparats (Nissl-Färbung); N=Neuron, G=Gliazelle, E=Endothelzelle (1)

2.3 Ermittlung der Axonanzahl im Nervus opticus

Mithilfe der Toluidinblau-Färbung können die Myelinscheiden der Axone im Nervus opticus dargestellt und somit der Auswertung zugänglich gemacht werden. Hierüber ist die Anzahl von Ganglienzellen in der Retina (RGC) nach dem IRI bestimmbar (295) und eine Differenzierung der RGC von der Gesamtzahl neuronaler Zellen in der GCL möglich. Die Toluidinblau-Färbung wurde in Kooperation mit *-aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der elektronischen Fassung entfernt-* (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

2.3.1 Anfertigung der Schnittpräparate und die Toluidinblau-Färbung

An die Fixierung in 2,5% Glutaraldehyd-Lösung nach der E nukleation schloss sich eine Nachfixierung in 1% Osmiumtetroxid-Lösung an. Hierdurch konnten insbesondere Lipide in Plasmamembranen fixiert und auch Myelinscheiden dargestellt werden (296). Es folgte die Einbettung in Kunststoff mit anschließender Polymerisation bei 60°C. Mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden Semidünnschnitte im Sinne von Querschnitten des N. opticus angefertigt und auf Standardobjektträger aufgebracht. Diese Schnittpräparate wurden dann in 1% Toluidinblau und 1% Natriumborat nach Standard gefärbt. Toluidinblau ist ein metachromatischer, basischer Thiazinfarbstoff (289, 297). Er lagert sich insbesondere an saure Substanzen (297) an und wird für Übersichtsfärbungen genutzt (298).

Substanzen, die über eine Metachromasie verfügen werden nicht blau, sondern rot dargestellt (297).

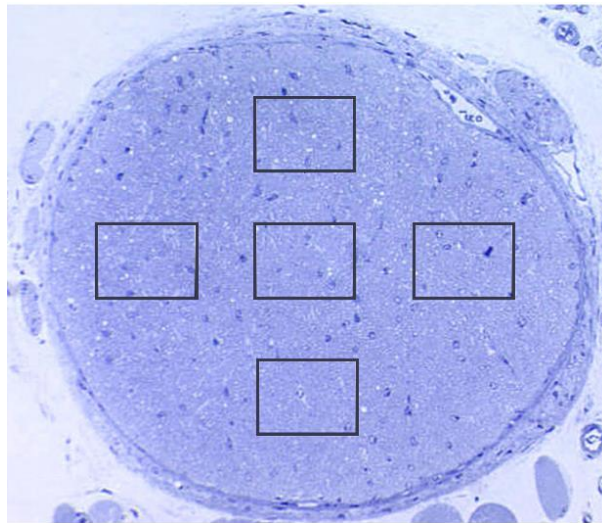


Abbildung V: Sehnervenquerschnitt mit Toluidinblau-Färbung, umrahmt sind die vordefinierten Bereiche zur Auswertung (295)

2.3.2 Ermittlung der Axonanzahl

Unter einem Stereolichtmikroskop (Vanox-T Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden über die angeschlossenen CCD-Kamera (Hitachi, Chiyoda (Tokio), Japan), pro Querschnitt (eines N. opticus) fünf Bereiche fotografiert. Hierbei wurden stets ein zentrales Bild und vier periphere, nicht überlappende Bilder à 80 x 60 µm angefertigt (siehe Abbildung V). Mithilfe der Open-Source-Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]) wurde die Axonanzahl durch einen verblindeten Untersucher ermittelt, sodass die mittlere Axonanzahl bestimmt werden konnte. Ein beispielhafter Ausschnitt der Ansicht unter dem Mikroskop wird in Abbildung VI gezeigt.

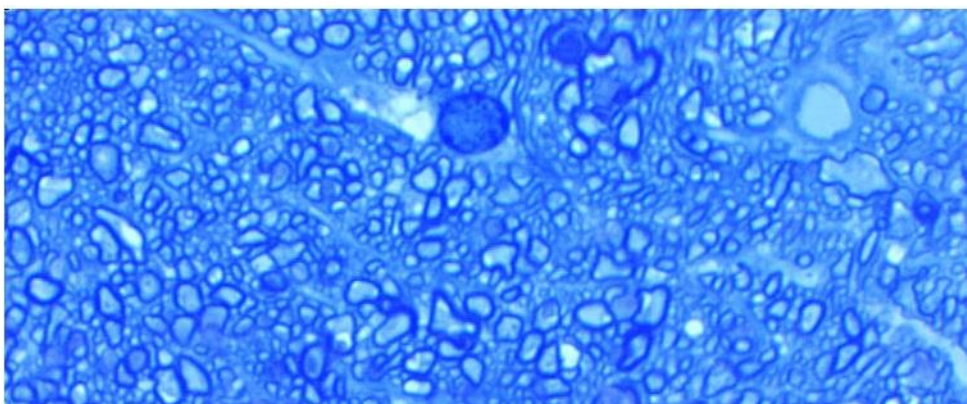


Abbildung VI: Sehnervenquerschnitt mit Toluidinblau-Färbung der Myelinscheiden aus der Referenzgruppe (Trägersubstanzen, Auge mit normalem IOP)

2.4 Dihydroethidium-Färbung zur ROS-Bestimmung

Bei der DHE-Färbung wird ein Fluoreszenzfarbstoff zur Bestimmung des Gehalts an ROS eingesetzt. Da es sich bei ROS um reaktionsfreudige und instabile Verbindungen handelt, wurden Kryoschnitte angefertigt, um ihre Konservierung bis zur Färbung zu gewährleisten.

2.4.1 Anfertigung der Schnittpräparate für die DHE - Färbung

Die Bulbi aus der zweiten Gruppe zur Bestimmung des ROS-Gehalts wurden nach der oben beschriebenen E nukleation (siehe III.1.5) in TissueTek® O.C.T.TM Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) orientiert eingebettet und bei -20°C tiefgefroren. Ab dem Folgetag wurden die Bulbi durch luftdichte Verpackungen vor Austrocknung geschützt und bei -80°C gelagert. Durch die Orientierung wurde gewährleistet, dass eine sagittale Schnittführung möglich war.

Die Schnittpräparate wurden an einem Rotationsmikrotom mit Kryostat CM1850 (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei -30°C erstellt. Nach dem Erreichen der Zieltemperatur im Kryostat wurden die Gewebeproben zur Akklimatisierung aus dem Gefrierschrank von -80°C dorthin verbracht.

Es wurde mithilfe der lichtmikroskopischen Kontrolle ungefärbter Schnitte die parazentrische Region um die Papille sicher identifiziert und hier dann Schnittpräparate von 10µm Dicke angefertigt. Pro Auge wurden mindestens vier Schnittpräparate von 10µm Dicke auf einem ebenfalls bei -30°C akklimatisierten Objektträger (SuperFrost® PlusTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) platziert. Durch die Akklimatisierung des Objektträgers wurde die vorzeitige Erwärmung der Schnittpräparate und der Abfall der ROS verhindert.

Mit dem zweiten Auge des entsprechenden Tieres wurde analog verfahren und die gewonnenen Schnittpräparate wurden auf demselben Objektträger platziert. Somit befinden sich die Schnittpräparate beider Augen eines Tieres auf demselben Objektträger und unterliefen bei der Färbung eine identische Prozedur. Es wurden mehrere Objektträger pro Tier angefertigt und die DHE-Färbung direkt im Anschluss durchgeführt. Während der Vorbereitung der Färbung verblieben die Schnittpräparate im Kryostat bei -30°C. Überzählige Schnittpräparate wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 Dihydroethidium-Färbung

Da Dihydroethidium (Hydroethidin, $C_{21}H_{21}N_3$; DHE, Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA) ein lichtempfindlicher Farbstoff ist, fanden die im Folgenden genannten Maßnahmen unter standardisierter, minimalster Beleuchtung statt.

Für die Färbung musste zunächst ausgehend von der Stammlösung mit einer DHE-Konzentration von 5 mM eine Verdünnungsreihe angesetzt werden. Durch die Zugabe von Dimethylschwefeloxid (DMSO, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und phosphatgepufferter Lösung (PBS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) wurde eine finale DHE-Konzentration von $1\mu\text{M}$ erreicht und der DMSO-Anteil der fertigen Lösung auf unter 1% gesenkt.

Aliquote mit je 1ml der DHE-Lösung wurden in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen (Safe Lock, 2,0 ml, ambra; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20°C gelagert. Es wurde eine lichtgeschützte Feuchtkammer gewässert und ein DHE-Aliquot bereitgestellt. Unmittelbar vor der Zugabe der DHE-Lösung wurde der Objektträger in der Feuchtkammer platziert und die Schnittpräparate vorsichtig mit 1ml DHE-Lösung pro Objektträger benetzt. Anschließend wurde die Kammer geschlossen und bei 37°C für 30min inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnittpräparate mit einem Deckplättchen versehen, die überschüssige DHE-Lösung vorsichtig entfernt und unverzüglich wie im Folgenden beschrieben Photographien der Präparate angefertigt.

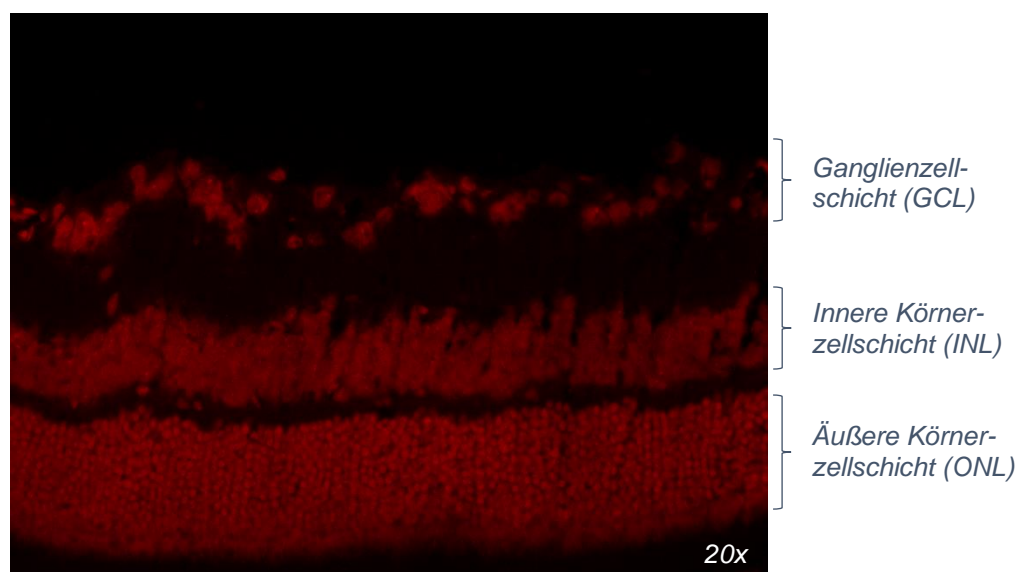


Abbildung VII: Kryoschnittpräparat der Retina (DHE-Färbung, TRITC-Filter, 20fache Vergrößerung)

2.4.3 Aufnahmen der DHE-gefärbten Schnittpräparate

Die gefärbten Schnittpräparaten wurden unter einem inversen Fluoreszenzstereomikroskop (Nikon Eclipse TS100 mit Nikon Intensilight C-HGFI; Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan) betrachtet, an welches eine CCD-Kamera (Nikon DS-Fi1, Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan) angeschlossen war. Da die Intensität der Fluoreszenz nach der Färbung mit der verstreichenden Zeit abnimmt, wurden die Aufnahmen der DHE-gefärbten Schnittpräparate so zügig wie möglich durchgeführt.

DHE reagiert mit $O_2^{\cdot-}$ zu 2-Hydroxyethidium (2-OH-Ethidium). Außerdem kann durch andere ROS Ethidium als unspezifisches Oxidationsprodukt entstehen (299, 300). 2-OH-Ethidium und Ethidium haben benachbarte Absorptionsmaxima und fluoreszieren beide rot. Weiterhin können sich auch nicht-fluoreszierenden Oxidationsprodukten bilden (299).

Für die Aufnahmen wurde ein Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-(TRITC)-Filter zur gezielten Anregung verwendet. Die Extinktions- und Emissionsmaxima von TRITC fallen in ähnliche Bereiche wie die von 2-OH-Ethidium und Ethidium (299, 301).

Nach einer raschen orientierenden Inspektion der Schnittpräparate wurden pro Auge jeweils zwei Aufnahmen der parazentrischen Region um die Papille unter 20facher Vergrößerung gewonnen (siehe Abbildung VII). Diese Aufnahmen wurden alternierend von beiden Augen mit einer Expositionsdauer von 2 Sekunden (Gain: 4,8) über die angeschlossene CCD-Kamera erstellt und mithilfe der Software NIS-Elements Basic Research (Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan) gesichert. Auch diese Aufnahmen wurden aufgrund der Lichtsensitivität der Fluoreszenzfarbstoffe im Dunkeln durchgeführt.

2.4.4 Auswertungsverfahren der DHE-Präparate

Die Auswertung erfolgte mithilfe der Open-Source-Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]). Mit diesem Programm ist es möglich in der Ganglienzellschicht die gemittelte Leuchtdichte bezogen auf eine entsprechende Fläche zu bestimmen (siehe Abbildung VIII). Es kann also die Intensität der DHE-Fluoreszenz unter Berücksichtigung der vorhandenen Zelldichte und Schichtdicke der GCL bestimmt werden. Hierdurch werden vergleichbare Daten ermittelt, da die Leuchtdichte pro Fläche auch den großen Schwankungen der Ganglienzellschichtdicken bzw. -dichten Rechnung tragen kann.

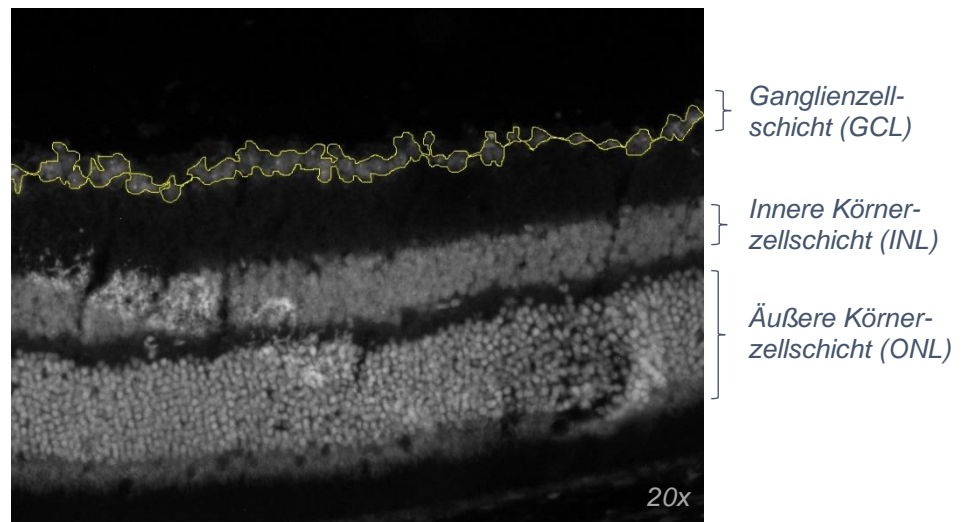


Abbildung VIII: Auswertung der DHE-Färbung mit ImageJ; die auszuwertende Fläche ist gelb umrahmt dargestellt

2.5 Bestimmung der postinterventionellen Genexpression

Die postinterventionelle Genexpression lässt sich anhand der mRNA durch eine quantitative Reverse - Transkriptase - Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) erfassen. Die PCR hat in der Medizin und Molekularbiologie seit ihrer Entwicklung und technischen Umsetzung 1985 durch Kary Mullis breite Anwendung zur Analyse der DNA gefunden (302, 303). Durch den Einsatz der reversen Transkriptase entsteht auf der Basis von RNA komplementäre DNA (cDNA), sodass auch mRNA-Level mittels qPCR erfasst werden können (13, 304). Die RT-qPCR gilt als sensitivstes Verfahren zur Quantifizierung von mRNA (302). Die nachfolgend beschriebenen Verfahren wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *-aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt-* (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz) realisiert.

2.5.1 Extraktion der mRNA

Zunächst musste aus den postinterventionellen Retinae die RNA extrahiert und von DNA sowie Proteinen isoliert werden. Die Retinae wurden hierfür nach der Eukleation und Präparation in flüssigem Stickstoff konserviert. Zur Extraktion wurde das Set peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) eingesetzt, welches für die gleichzeitige Isolation von RNA, DNA und Proteinen über die Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode genutzt werden kann. Ein ausführliches Protokoll ist online³ abrufbar, während hier eine zusammenfassende Darstellung folgt:

³ https://ru.vwr.com/assetsvc/asset/ru_RU/id/17035117/ contents, abgerufen 17.03.2020

Nach der Homogenisierung des Gewebes mit der TriFast-Lösung (Guanidinisothiocyanat/Phenol-Mischung) wurde durch den Zusatz von Chloroform (0,2ml/ml TriFast-Lösung) eine Phasentrennung erzielt. In der wässrigen Phase befindet sich die RNA, welche von den übrigen Phasen isoliert wurde. Durch die Zugabe von Isopropanol (0,5ml / ml TriFast-Lösung) präzipitierte die RNA, welche sodann in 75% Ethanol gewaschen und anschließend in einem passenden Medium (deionisiertes Formamit, 0,5% SDS, H₂O) gelöst wurde.

2.5.2 Gewinnung von cDNA

Um anhand der RNA cDNA zu gewinnen und diese als Substrat der DNA-Polymerase der PCR zuführen zu können, kam das Enzym reverse Transkriptase (RT) zum Einsatz (246). Hier wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) eingesetzt. Die ausführliche Beschreibung der Materialien und der detaillierte Ablauf können ebenfalls online⁴ abgerufen werden. Diese gebrauchsfertige, gepufferte Lösung enthält neben der MultiScribe™ RT, Primer und Desoxynukleotide. Die extrahierte RNA wurde zugesetzt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Im Thermocycler (CFX Connect Real-Time System 185-5200, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurden dann verschiedene Temperaturstufen durchlaufen und durch die RT aus der RNA cDNA gewonnen. Damit stand am Ende der Reaktion das Ausgangsprodukt für die PCR zur Verfügung.

2.5.3 Das Prinzip der PCR

Die PCR dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen (305). Pro Zyklus verdoppelt sich (in der Theorie) die Anzahl der replizierten DNA-Kopien; am Ende werden demnach 2^c Kopien (c =Anzahl verwendeter Zyklen) pro initialem cDNA-Molekül gewonnen. Neben der cDNA als Matrize werden eine hitzestabile DNA-Polymerase, Primersequenzen passend zu den zu replizierenden cDNA-Sequenzen und Desoxynukleotide zugefügt (303).

Ein Zyklus in der PCR besteht aus drei Phasen: der Denaturierungs-, der Hybridisierungs- und der Elongationsphase (siehe Abbildung IX). Während einer PCR werden in der Regel zwischen 25 – 35 Zyklen durchlaufen (303):

⁴ https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042557.pdf, abgerufen 17.03.2020

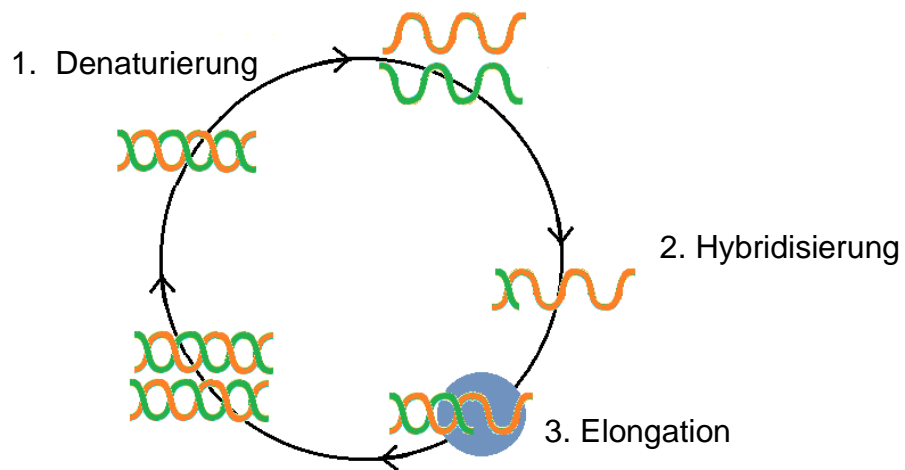


Abbildung IX: Prinzip der PCR

1. Durch die Erwärmung des Ansatzes auf 94-98°C lösen sich die DNA-Stränge voneinander und liegen als Einzelstränge vor (Denaturierung).
2. Nach einer Abkühlung auf eine Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der Primer können sich diese an die DNA anlagern und mit den passenden Sequenzen hybridisieren (Hybridisierung / Annealing).
3. Eine erneute Erwärmung auf das Temperaturoptimum der zugesetzten DNA-Polymerase, hier eine hitzestabile Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) mit einem Optimum zwischen 70-80°C, führt zur Elongation der Primer und Komplettierung des DNA-Einzelstrang-Primer-Komplexes zu einem DNA-Doppelstrang (Elongation).

Der letzte Elongationsschritt hat eine längere Dauer und erlaubt den Abschluss gegebenenfalls zuvor nicht komplettierter DNA-Doppelstränge. Zur Beendigung der PCR kann eine Abkühlung auf 4°C erfolgen oder EDTA zugesetzt werden (Termination).

2.5.4 Hot-Start PCR

In diesem Experiment wurde die PCR in einem StepOnePlus™ - Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) unter Verwendung des SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) durchgeführt (ausführliche Protokoll: siehe online⁵). Hierbei handelt es sich um eine Hot-Start PCR, die mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I (C₃₂H₃₇N₄S Zipper) quantifiziert werden kann. Der Ansatz enthielt zudem einen internen Referenzfarbstoff mit einem Extinktionsmaximum bei λ=586nm und einem

⁵ <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/s4438bul.pdf>, abgerufen 17.03.2020

Emissionsmaximum bei $\lambda=605\text{nm}$. Die verwendeten Primer finden sich nachstehend (siehe III.2.2.5). Die Besonderheit der Hot-Start PCR liegt darin, dass hier durch einen Antikörper die DNA-Polymerase gehemmt wird. Erst bei Temperaturen über 70°C dissoziiert der Antikörper-Enzym-Komplex und die DNA-Polymerase erreicht ihre volle Aktivität (siehe VIII.4 Protokoll 3). Hierdurch wird die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen, die unspezifisch an Primer gebunden haben, vermindert (302).

SYBR Green I bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA und fluoresziert nur in dieser gebundenen Form grün ($\lambda\approx 521\text{nm}$), wenn er mit blauem Licht ($\lambda\approx 495\text{nm}$) angeregt wird (302, 306). In jedem Zyklus verdoppelt sich der Gehalt doppelsträngiger DNA, sodass auch die Bindungsstellen für SYBR Green I und damit die Fluoreszenz zunimmt. Hierdurch kann während der laufenden PCR die Replikation verfolgt werden (Real Time-PCR) und der Quantifizierung dienen (302).

2.5.5 Verwendete Primersequenzen (forward – reverse)

nNOS (TCCACCTGCCTCGAAACC) – (TTGTCGCTGTTGCCAAAAAC);
eNOS (CCTTCCGCTACCAGCCAGA) – (CAGAGATCTTCACTGCATTGGCTA)
iNOS (CAGCTGGGCTGTACAAACCTT) – (CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG)
NOX1 (GGAGGAATTAGGCAAAATGGATT) – (GCTGCATGACCAGCAATGTT)
NOX2 (CCAAGTGGGATAACGAGTTCA) – (GAGAGTTTCAGCCAAGGCTTC)
NOX4 (TGTAACAGAGGGAAAACAGTTGGA) –
(GTTCCGGTTACTCAAACCTATGAAGAGT)
SOD1 (CCAGTGCAGGACCTCATTTTAAT) – (TCTCCAACATGCCTCTCTTCATC)
SOD2 (GCTCTGGCCAAGGGAGATG) – (TGTCCCCCACCATTGAACTT)
SOD3 (TTCTTGTTCTACGGCTTGCTACTG) – (AGCTGGACTCCCCTGGATTT)
CAT (CAAGTACAACGCTGAGAAGCCTAAG) – (CCCTTCGCAGCCATGTG)
GPx1 (CCTTGCCAACACCCAGTGA) – (CCGGAGACCAAATGATGTACTTG)
HO1 (GGTGATGCTGACAGAGGAACAC) – (TAGCAGGCCTCTGACGAAGTG)
TBP (CTTCGTGCAAGAAATGCTGAAT) – (CAGTTGTCCGTGGCTCTCTTATT)

2.5.6 Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung ist trotz ihres Namens eher eine schätzende Messung der DNA-Kopienzahl und weist insbesondere in Bezug auf die mRNA Schwächen auf. Deshalb wurde eine relative Quantifizierung durch den Vergleich der C_T -Werte (C_T : threshold cycle value, Schwellenwertzyklus) angewandt.

Der C_T ist der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den Schwellenwert zur Signifikanz überschreitet. Er ist umgekehrt proportional zur ursprünglichen Anzahl von cDNA-Kopien: je mehr Kopien vorhanden sind, desto schneller wird der Schwellenwert erreicht. Über den C_T -Wert kann anhand von Standardkurven auf die ursprüngliche Kopienanzahl rückgeschlossen und diese mithilfe eines Haushaltsgens normiert werden. Hierdurch erhält man die relative Genexpression der gesuchten Enzyme. Der Schwellenwert wird hierbei so gewählt, dass die exponentielle Phase der PCR erfasst wird, in der die oben dargestellten Reaktionen unter optimalen Bedingungen ablaufen (302).

Da SYBR Green I zur Quantifizierung verwendet wird und unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet, kann keine Multiplex-Analyse durchgeführt werden, sondern das Haushaltsgen und die entsprechenden Zielgene müssen in jeweils einem eigenen Gefäß erfasst werden. Über verschiedene Gefäße kann das für sich genommen unspezifische Fluoreszenzsignal jedoch der jeweiligen DNA-Sequenz zugeordnet werden (siehe VIII.4 Protokoll 3, (302)). Als Haushaltsgen, auf das die Genexpression normiert wird, dient das TATA-binding Protein (TBP) und als Referenzwert (=100%) gilt jeweils die Expression im NP-Auge der Kontrollgruppe (Trägersubstanz).

3. Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 6 und SPSS23. Beim Vergleich zweier Gruppen wurden ein gepaarter bzw. ungepaarter, zweiseitiger t-Test angewandt. Bei der Prüfung der Signifikanz zwischen mehr als zwei Gruppen wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Korrektur bzw. Games-Howell-Test entsprechend angepasst. Die Werte werden im Folgenden in der Form Mittelwert \pm Standardfehler auf den Mittelwert (SEM, engl. standard error of the mean) oder Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, engl. standard deviation) angegeben und entsprechend kenntlich gemacht.

IV. Ergebnisse

1. Veränderung des Gewichts

Im Verlauf des Beobachtungszeitraums haben alle Tiere Gewicht verloren (siehe Abbildung X), aber die vorgeschriebene Untergrenze nicht unterschritten. Diese Grenze liegt bei einem Verlust von 20% des Ausgangsgewichts.

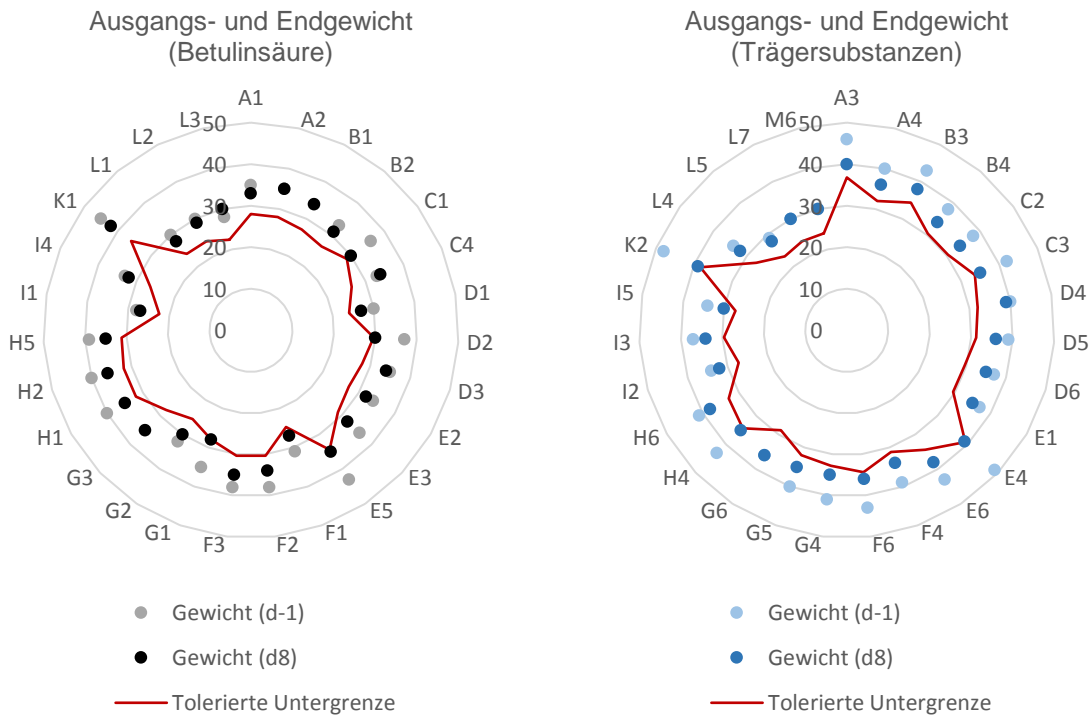


Abbildung X: Ausgangs- und Endgewicht [g] unter Betulinsäure (links) bzw. den Trägersubstanzen (rechts); in rot ist die vorgegebene Untergrenze dargestellt (80% des Ausgangsgewichts)

In beiden Gruppen sind signifikante Gewichtsverluste aufgetreten, jedoch ist das Ausmaß des Verlusts nicht signifikant ($p > 0,05$) verschieden (siehe Abbildung XI).

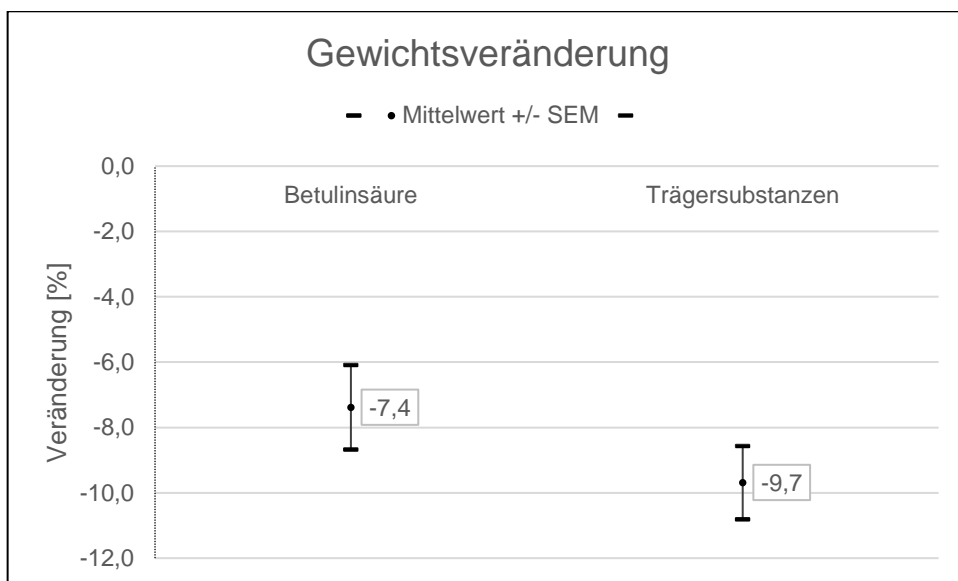


Abbildung XI: Veränderungen des Gewichts in Bezug auf das Ausgangsgewicht [%] während des Experiments (d-1 bis d8); Darstellung: Mittelwert +/- Standardfehler auf den Mittelwert (SEM)

2. Beobachtung des Intraokularsdrucks (IOP)

Alle mittleren IOP-Werte liegen vor und nach dem IRI im physiologischen Bereich des IOPs bei C57/B6J-Mäusen⁶. In Abbildung XII ist die Verteilung der IOP-Mittelwerte der Einzelmessungen pro Tier (A1 - M6) und der jeweiligen Gruppe (nach Auge und Substanz) am achten Tag der Reperfusion gezeigt. Abbildung XIII vergleicht die IOP-Mittelwerte beider Gruppen am Vortag des IRI und am achten Tag der Reperfusion

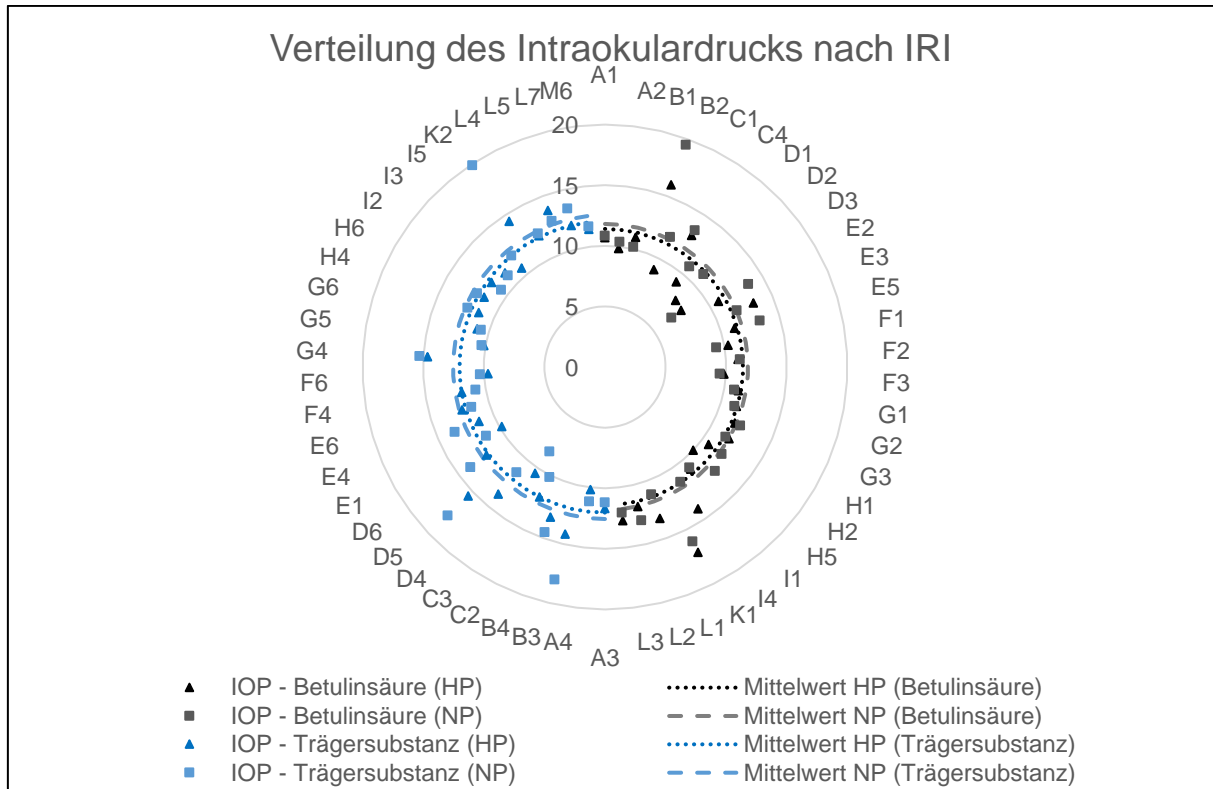


Abbildung XII: Postischämische Verteilung des Intraokularsdrucks (d8) unter Betulinsäure (rechts) und den Trägersubstanzen (links); die Werte liegen unter der tolerierten Obergrenze von 24,7mmHg (in rot); NP=Normaldruck; HP=Hochdruck

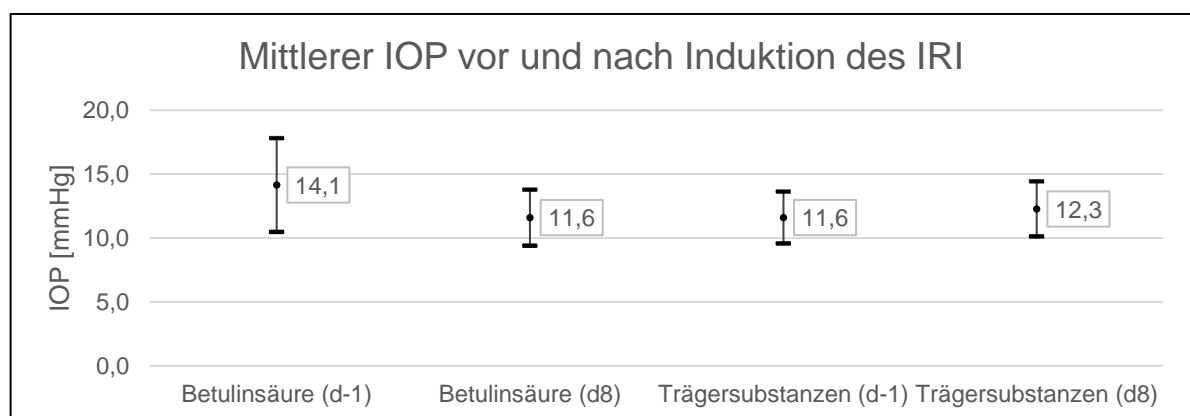


Abbildung XIII: Intraokularsdruck am Vortag (d-1) der IRI-Induktion und am achten Tag (d8) der Reperfusion für die Behandlungsgruppe (Betulinsäure) und Kontrollgruppe (Trägersubstanzen); Darstellung: Mittelwert +/- Standardabweichung.

⁶ unter Berücksichtigung der Varianz bei der Messung des IOPs, siehe dazu auch bei Qiu (281. Qiu Y, Yang H, Lei B. Effects of three commonly used anesthetics on intraocular pressure in mouse. Current eye research. 2014;39(4):365-9.)

Vorbemerkung zu den Ergebnissen

Im Folgenden werden die Unterschiede im Überleben verschiedener Neurone der Ganglienzellschicht, des oxidativen Stresses und der Genexpression betrachtet. Dabei wird sowohl auf die Unterschiede zwischen den Augen mit (HP, *high pressure*) und ohne (NP, *normal pressure*) Erhöhung des Intraokular drucks (IOP) innerhalb der jeweiligen Gruppen, als auch auf die Kontraste zwischen der Kontroll- (Trägersubstanzen) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure) eingegangen.

Der Wert des NP-Auges der Kontrollgruppe dient als Referenzwert (=100%) für sämtliche Veränderungen, da sich hier nur die Effekte der Kanülierung ohne Induktion einer Ischämie und der Trägersubstanzen niederschlagen.

3. Anzahl der Neuronen in der Ganglienzellschicht (GCL) und Anzahl der retinalen Ganglienzellen (RGC)

Am achten postischämischen Tag lässt sich in den Flachpräparaten (Abbildung XIV) der Kontrollgruppe ein hochsignifikanter Abfall der Neuronenanzahl in der GCL des HP-Auges im Vergleich zum NP-Auge feststellen ($p < 0,01$). In der Behandlungsgruppe bleibt ein signifikanter Abfall der Neuronenanzahl in der Retina aus ($p > 0,05$). Die Anzahl der Neurone im HP-Auge der Behandlungsgruppe ist zudem signifikant höher ($p < 0,05$), als im HP-Auge der Kontrollgruppe, während sich die Werte zu den und zwischen den NP-Augen nicht signifikant unterscheiden.

Abbildung XV zeigt zur Veranschaulichung einen Vergleich von vier Flachpräparaten. Diese zeigen exemplarisch die Retinae der HP- und NP-Augen der Behandlungs- und Kontrollgruppe.

Auch der Verlust von RGC (Abbildung XVI), die über ihre Axone im Sehnerven erfasst werden können (295), ist in der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$). In der Behandlungsgruppe ist die Axonanzahl nicht signifikant reduziert. Die Werte der HP- und NP-Augen der Gruppe unter Betulinsäure sind jedoch signifikant ($p < 0,05$) größer als im HP-Auge der Kontrollgruppe, während kein signifikanter Unterschied zum Referenzwert (Kontrollgruppe, NP-Auge) besteht.

Abbildung XVII zeigt ebenfalls einen exemplarischen Vergleich von Sehnervenquerschnitten der vier untersuchten Gruppen.

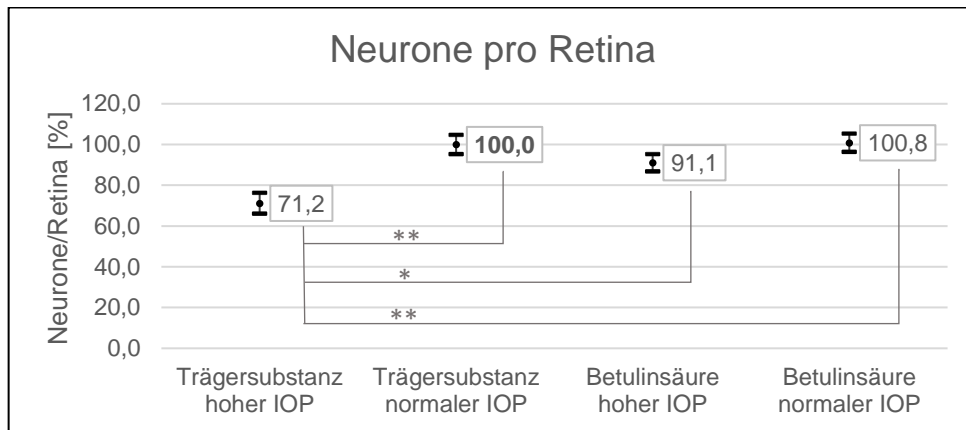


Abbildung XIV: relative Anzahl der Neurone in der GCL pro Retina unter den Trägersubstanzen und unter Betulinsäure; die Werte sind auf die nicht-ischämische Retina der Kontrollgruppe normiert (100%). Darstellung: Mittelwert +/- SEM; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

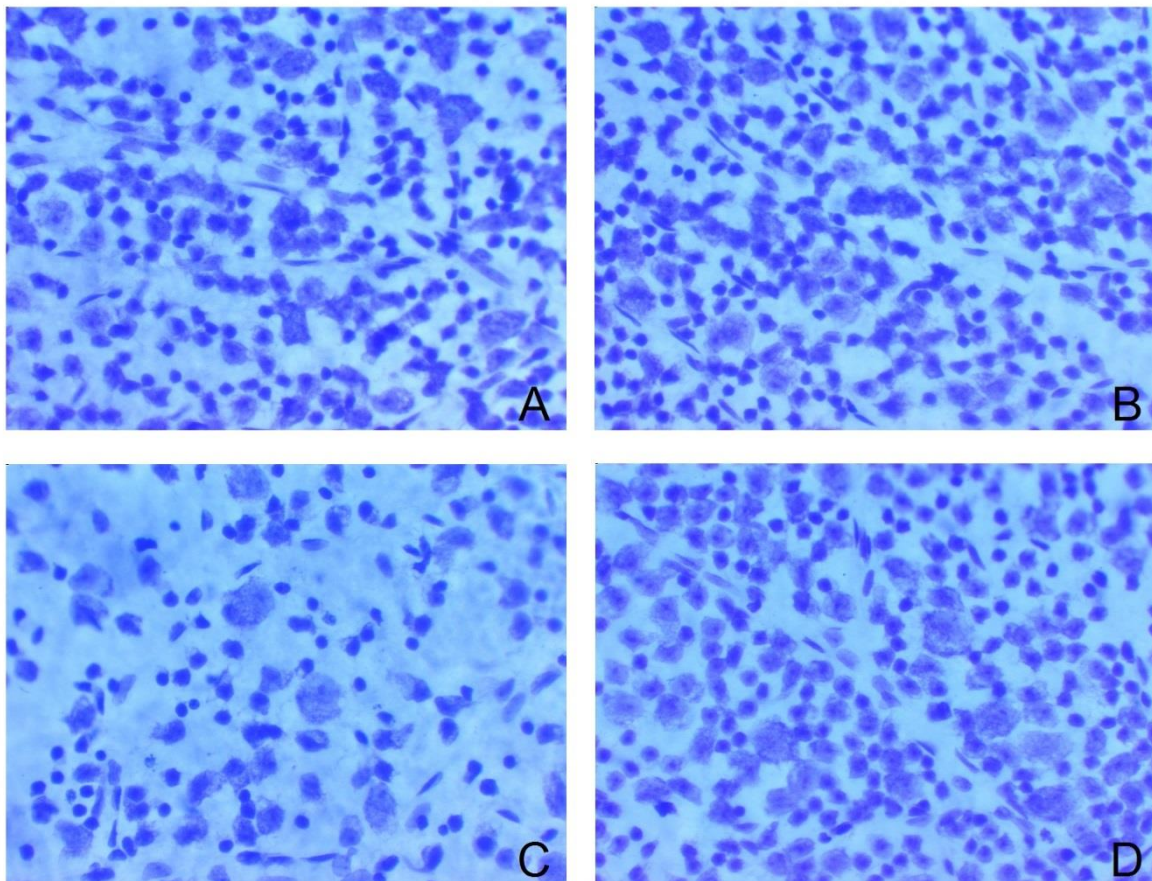


Abbildung XV: Beispielhafter Vergleich der Flachpräparate mit Kresylblau-Färbung aus der Behandlungs- (A – Betulinsäure, hoher IOP; B – Betulinsäure, normaler IOP) und Kontrollgruppe (C – Trägersubstanzen, hoher IOP; D – Trägersubstanzen, normaler IOP)

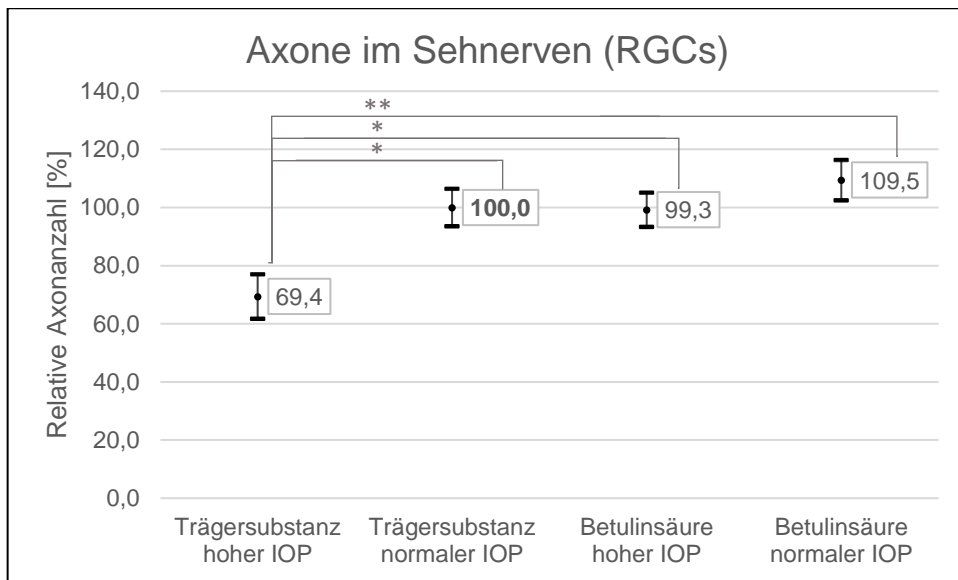


Abbildung XVII: Relative Anzahlen der RGC pro Retina in der Kontroll- (Trägersubstanzen) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure) anhand der Axone der jeweiligen Sehnerven. Der NP-Wert der Kontrollgruppe dient als Referenzwert (100%). Darstellung: Mittelwert +/- SEM; ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$

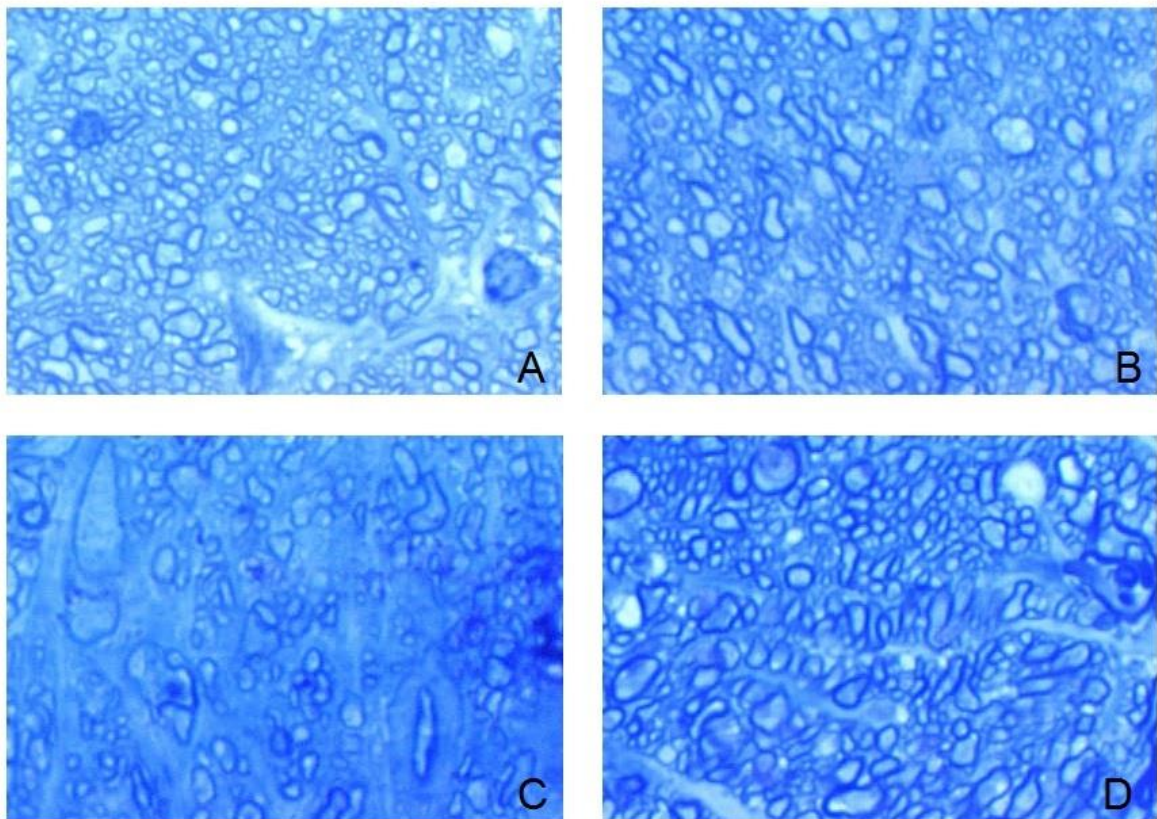


Abbildung XVIII: Beispielhafter Vergleich der Sehnervenquerschnitte mit Toluidinblau-Färbung in der Behandlungsgruppe (A – Betulinsäure, hoher IOP; B – Betulinsäure, normaler IOP) und Kontrollgruppe (C – Trägersubstanzen, hoher IOP; D – Trägersubstanzen, normaler IOP) mit und ohne IRI

4. Der oxidative Stress beim retinalen IRI

Die DHE-Färbung zeigt keine signifikanten Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten zwischen oder innerhalb der Kontroll- und Behandlungsgruppe ($p > 0,05$). Dies spricht gegen unterschiedliche ROS-Konzentrationen oder das Auftreten von oxidativem Stress am achten postischämischen Tag (siehe Abbildung XVIII).

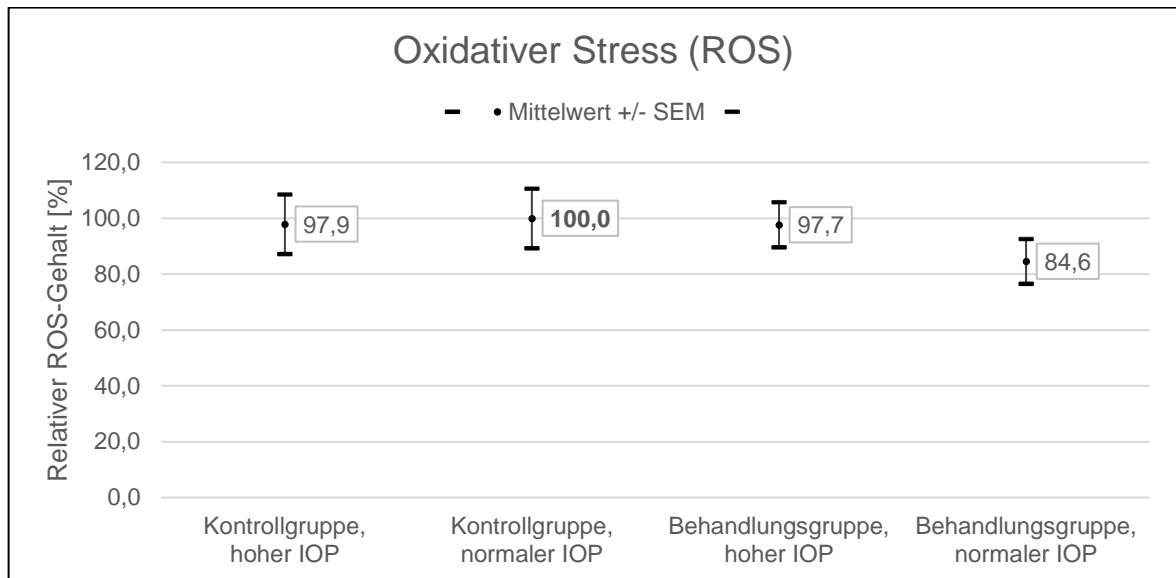


Abbildung XVIII: Fluoreszenzintensitäten der DHE-Färbung zum Nachweis von erhöhten ROS-Konzentrationen (oxidativem Stress) in den Retinae der Behandlungs- und Kontrollgruppe. Darstellung: Mittelwert +/- SEM

5. Veränderungen der Genexpression beim retinalen IRI

Die Expression der NOX1, SOD2, CAT, GPX1 und aller NOS-Isoformen ist am achten Tag der Reperfusion (d8) unverändert. Die relativen mRNA-Level der NOX2 sind in den Retinae der HP-Augen der Kontroll- und Behandlungsgruppe signifikant gegenüber den NP-Augen erhöht. Unter Betulinsäure finden sich zudem signifikant erhöhte mRNA-Level der NOX4, SOD1, SOD3 und HO1 in den Retinae der HP-Augen verglichen mit den NP-Augen in der Behandlungsgruppe. Die Veränderungen sind nachfolgend im Einzelnen dargestellt.

5.1 Expression der NADPH-Oxidasen beim retinalen IRI

1. NOX1 beim retinalen IRI

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Level der NOX1 zwischen den HP- und NP-Retinae innerhalb oder zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe am achten Tag (d8) der Reperfusion (Abbildung XIX).

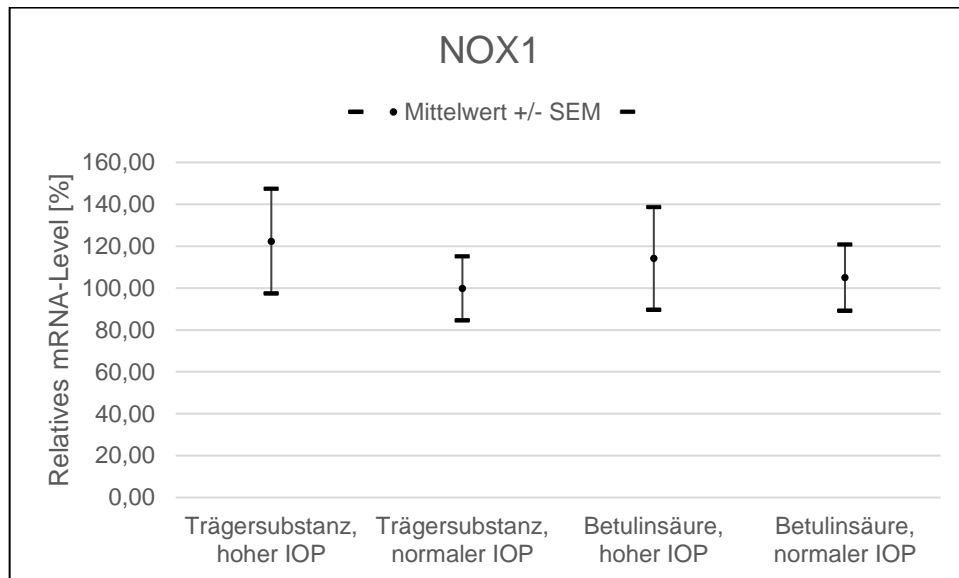


Abbildung XIX: Relative mRNA-Level der NOX1 beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM

2. NOX2 beim retinalen IRI

In der Kontroll- und Behandlungsgruppe ist die NOX2-Expression in den HP-Augen gegenüber den jeweiligen NP-Augen signifikant verstärkt (siehe Abbildung XX).

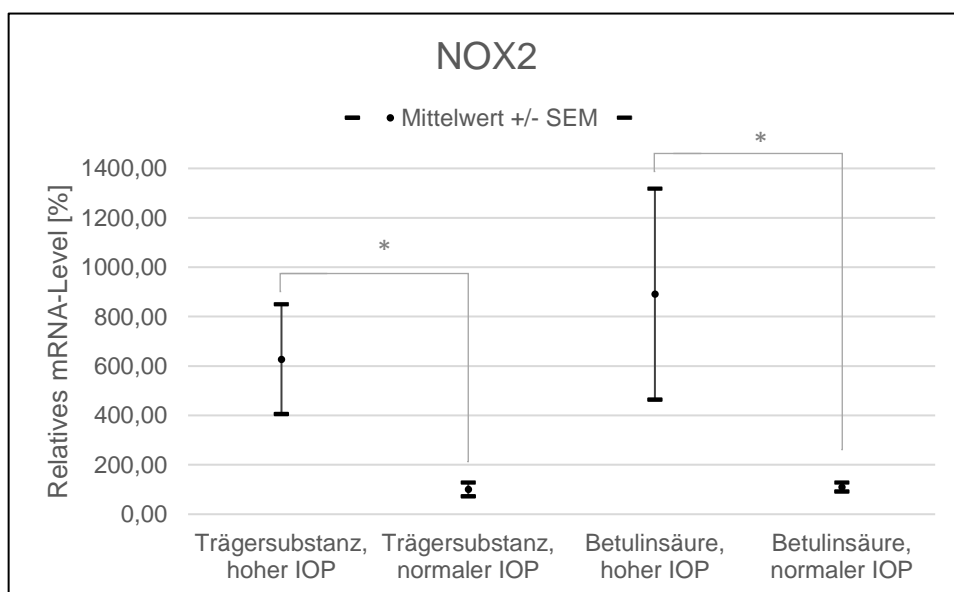


Abbildung XX: Relative mRNA-Level der NOX2 in der Retina nach IRI (d8) der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM, * $p < 0,05$

3. NOX4 beim retinalen IRI

Die mRNA-Level der NOX4 sind in der Kontrollgruppe unverändert. Unter der Gabe von Betulinsäure zeigt sich in den HP-Augen ein signifikanter Anstieg der NOX4-Expression gegenüber den NP-Augen sowie der Kontrollgruppe (siehe Abbildung XXI).

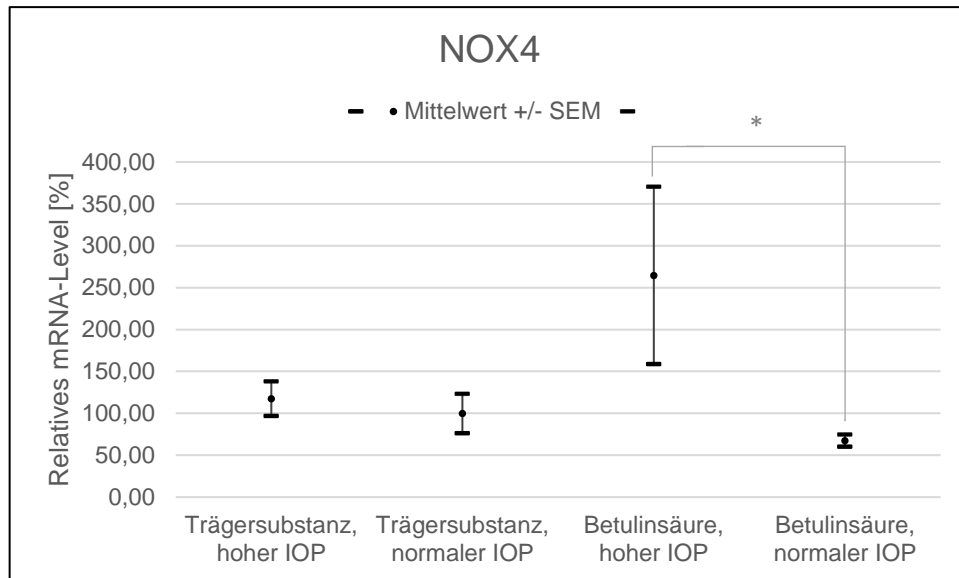


Abbildung XXI: Relative mRNA-Level der NOX4 in der Retina beim IRI (d8) der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM; * $p < 0,05$

5.2 Expression der Superoxiddismutasen beim retinalen IRI

1. SOD1 beim retinalen IRI

Die mRNA-Level der SOD1 sind in der Kontrollgruppe unverändert. Unter der Gabe der Betulinsäure zeigt sich in den HP-Augen ein signifikanter Anstieg der SOD1-Expression gegenüber den NP-Augen sowie der Kontrollgruppe (Abbildung XXII).

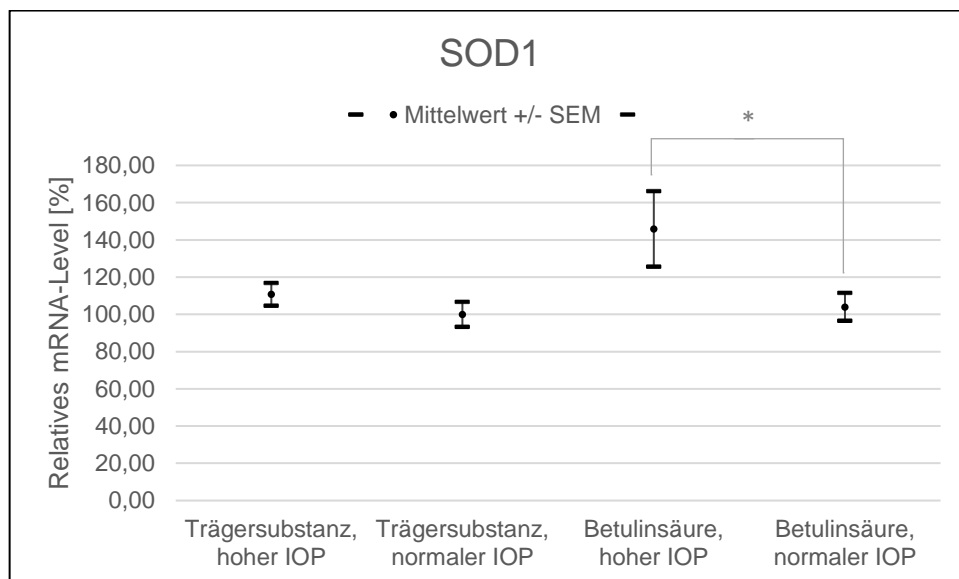


Abbildung XXIII: Relative mRNA-Level der SOD1 in der Retina beim IRI (d8) der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM, * $p < 0,05$

2. SOD2 beim retinalen IRI

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Level der SOD2 zwischen den HP- und NP-Retinae innerhalb oder zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe. Die relative Expression ist in Abbildung XXIII dargestellt.



Abbildung XXIII: Relative mRNA-Level der SOD2 in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM

3. SOD3 beim retinalen IRI

Die mRNA-Level der SOD3 sind in der Kontrollgruppe unverändert. Unter der Gabe der Betulinsäure zeigt sich in den HP-Augen ein signifikanter Anstieg der SOD3-Expression gegenüber den NP-Augen sowie der Kontrollgruppe (Abbildung XXIV).

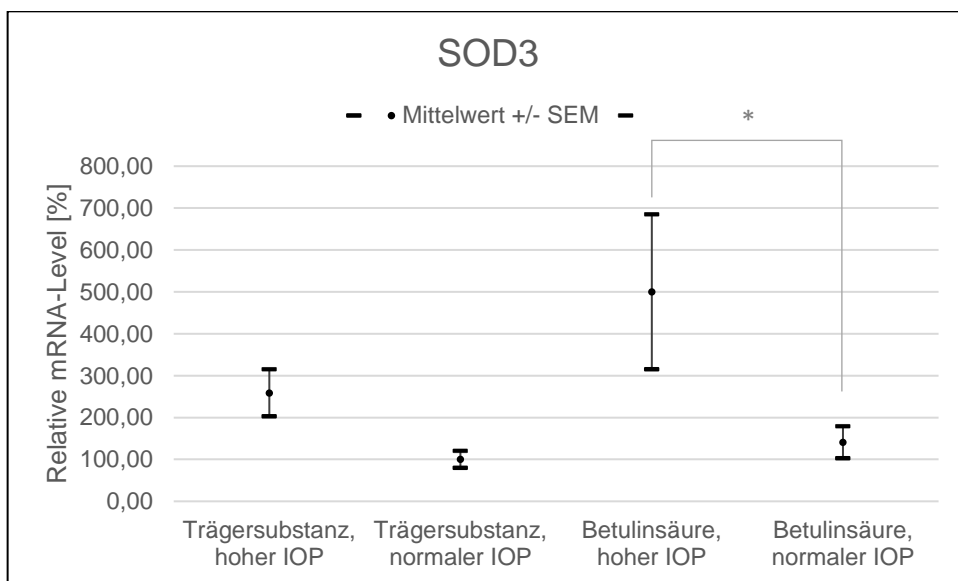


Abbildung XXIV: Relative mRNA-Level der SOD3 in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM, * $p < 0,05$

5.3 Expression der Katalase, Glutathionperoxidase 1, Hämoxxygenase 1 beim IRI

1. CAT beim retinalen IRI

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Level der CAT zwischen den HP- und NP-Retinae innerhalb oder zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe. Die relative Expression ist in Abbildung XXV dargestellt.

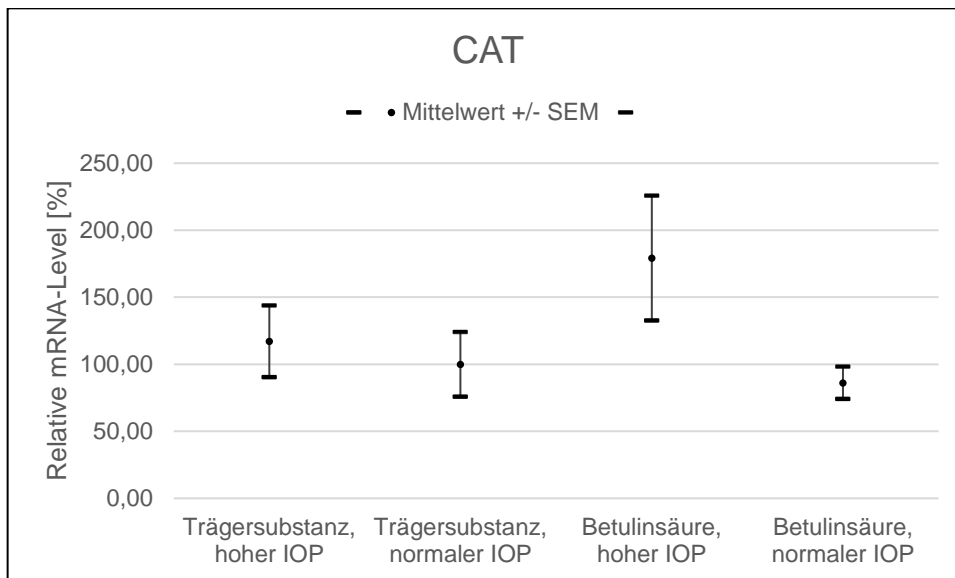


Abbildung XXV: Relative mRNA-Level der CAT in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM

2. GPX1 beim retinalen IRI

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Level der GPX1 zwischen den HP- und NP-Retinae weder innerhalb noch zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe (siehe Abbildung XXVI).

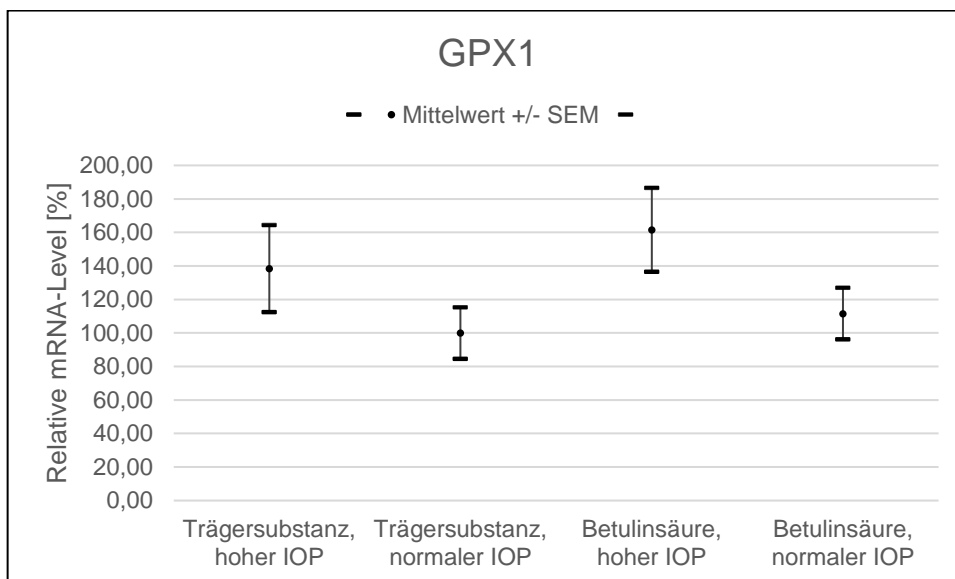


Abbildung XXVI: Relative mRNA-Level der GPX1 in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM

3. HO1 beim retinalen IRI

Die mRNA-Level der HO1 sind in der Kontrollgruppe unverändert. Unter der Gabe der Betulinsäure zeigt sich in den HP-Augen ein signifikanter Anstieg der HO1-Expression gegenüber den NP-Augen sowie der Kontrollgruppe (Abbildung XXVII).

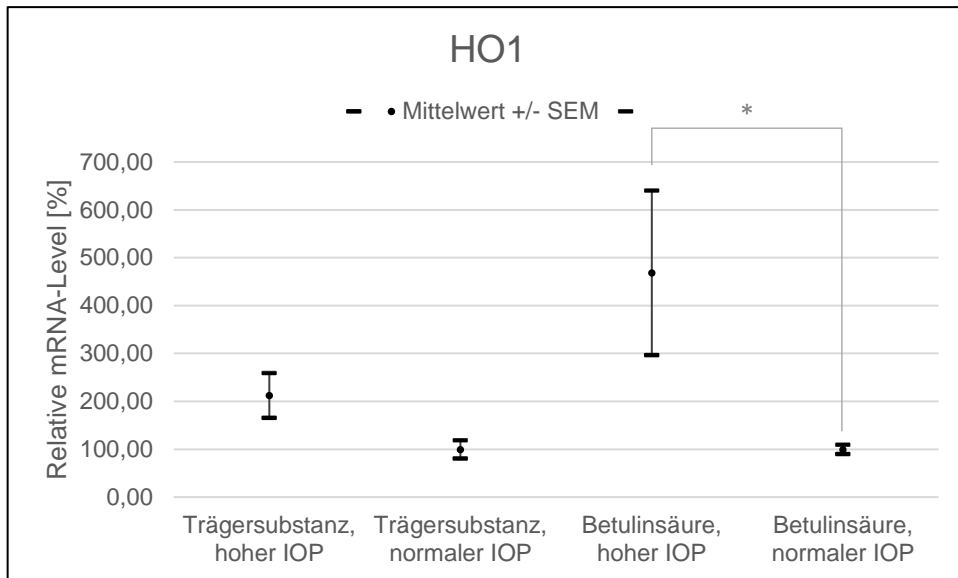


Abbildung XXVII: Relative mRNA-Level der HO1 in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM, * $p < 0,05$

5.4 Expression der NO-Synthasen beim retinalen IRI

Es gibt keine signifikanten Unterschiede der relativen mRNA-Level der nNOS, iNOS oder eNOS zwischen den HP- und NP-Retinae innerhalb oder zwischen der jeweiligen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Die Verteilungen der einzelnen Isoformen können den Abbildungen XXVIII A bis C entnommen werden.

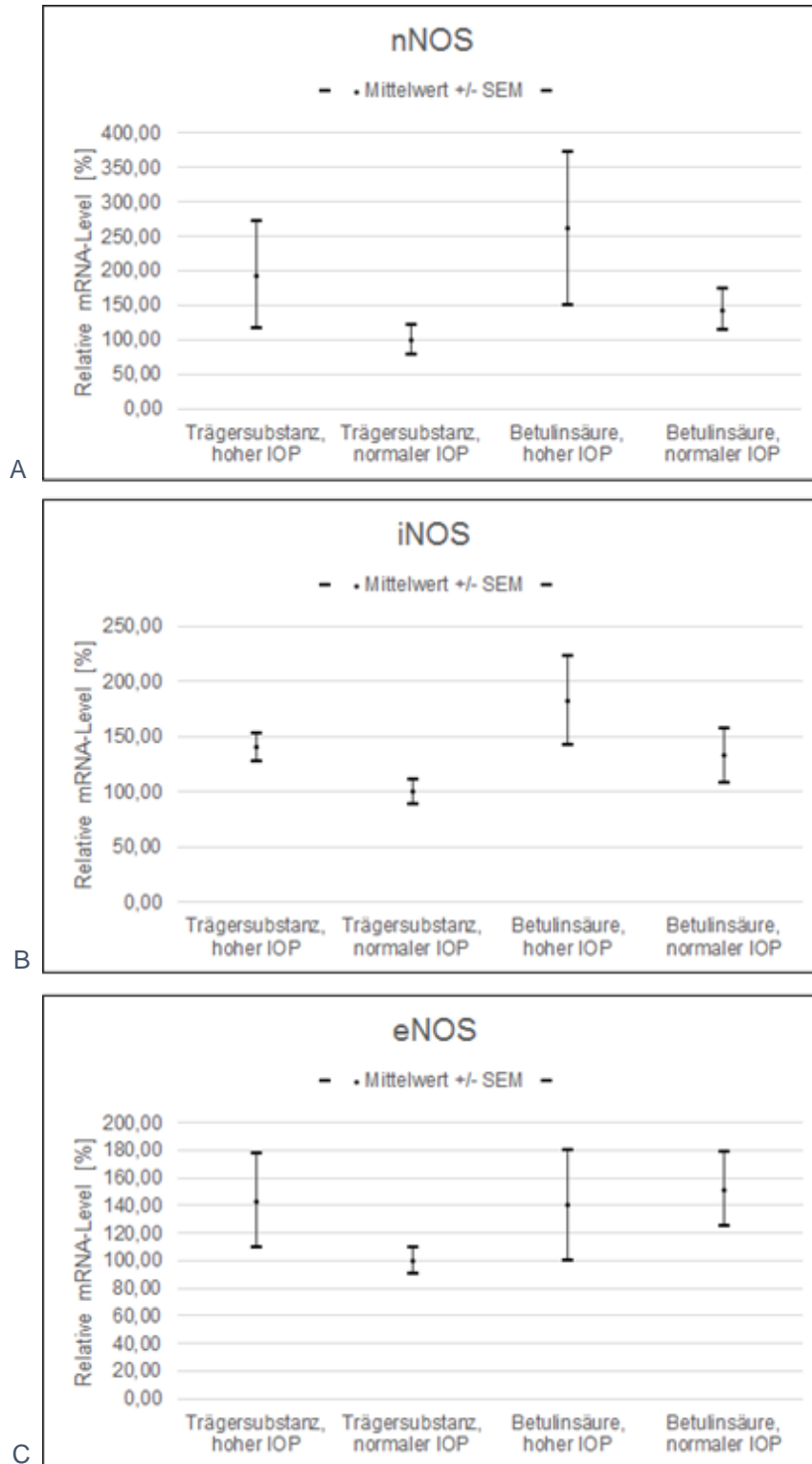


Abbildung XXVIII: Relative mRNA-Level der NOS (A - nNOS; B - iNOS; C - eNOS) in der Retina beim IRI (d8) in der Kontroll- (Trägersubstanz) und Behandlungsgruppe (Betulinsäure); Referenzwert: mRNA-Level im NP-Auge der Kontrollgruppe (100%); Darstellung: Mittelwert +/- SEM;

V. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Gabe von Betulinsäure beim retinalen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) das Ausmaß der neuronalen Schädigung reduziert und daher protektiv wirkt. Am achten Tag der Reperfusion ist kein oxidativer Stress mehr über den ROS-Gehalt des Gewebes nachweisbar, aber es zeigen sich langfristige Wirkungen der Betulinsäure auf die Genexpression pro- und antioxidativer Enzyme. Die mRNA-Level von NOX1, SOD2, CAT, GPX1 und der drei NOS-Isoformen weisen zum Untersuchungszeitpunkt keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Die NOX2-Expression ist hingegen nach dem IRI langfristig erhöht, ohne dass ein signifikanter Einfluss der Betulinsäure zu bestehen scheint. Im Gegensatz hierzu sind die mRNA-Level der antioxidativen Enzyme SOD1, SOD3 und HO1 und die Expression der NOX4 unter der Gabe von Betulinsäure nach acht Tagen Reperfusion gesteigert.

1. Bekannte Auswirkungen der Betulinsäure beim (retinalen) IRI

Die Betulinsäure hat sich bereits in der Niere (307), dem Myokard (308) sowie dem Gehirn (253, 269, 309) als protektiv beim IRI erwiesen. Von den genannten Organen dürfte das Gehirn der Retina am ähnlichsten sein, da die Retina Teil des Gehirns, genauer gesagt eine Ausstülpung des Dienzephalons ist (14-16).

Bei dem In-vitro-Modell des IRI (Glukose- und Sauerstoffmangel, OGD) treten an zentralen Neuronen (Hippocampus) von Ratten (Sprague Dawley) unter Betulinsäure eine Reduktion der ROS-Produktion und oxidativer Schäden, sowie antiapoptotische Effekte auf (309). Auch in vivo scheint sich die antioxidative Wirkung der Betulinsäure beim zerebralen IRI zu bestätigen: bei Apoprotein-E-Knockout-Mäusen wird insbesondere die NOX2-Expression postischämisch gehemmt (269), während beim Wildtyp (Kunming) der verminderte Anstieg der NOX4-mRNA-Level von Vorteil zu sein scheint (253). Auch sind antinitrosative Effekte beim zerebralen IRI unter Betulinsäure beschrieben (269). Insgesamt wird der Betulinsäure damit eine neuroprotektive Wirkung bescheinigt (253, 269, 309).

Beim renalen IRI unter Betulinsäure konnte an Ratten (Wistar) neben der Hemmung der postischämischen Leukozyteninfiltration sowie einem allgemeinen Schutz vor oxidativem Stress, auch ein Funktionserhalt der Natrium-Kalium-ATPase beobachtet werden (307). Dies spricht neben ihren antioxidativen Eigenschaften auch für eine günstige Wirkung der Betulinsäure auf die zelluläre Homöostase (siehe auch II.1.1, II.1.2), welche zu ihrer protektiven Gesamtwirkung beitragen könnte.

Eine Gabe der Betulinsäure beim myokardialen IRI bei Ratten (Sprague Dawley) scheint die Erholung der Funktion zu fördern und hemmend auf Nekrose und Apoptose zu wirken, da unter anderem das Verhältnis von Proteinen aus der Bcl-Familie günstig beeinflusst wird (308).

Somit scheinen die antioxidativen, antiapoptotischen und antinitrosativen Eigenschaften sowie ein günstiger Einfluss auf die zelluläre Homöostase zu den Einzelkomponenten der protektiven Gesamtwirkung der Betulinsäure beim IRI zu zählen (253, 269, 307-309). Die bisherigen Erkenntnisse zur Betulinsäure bilden die Grundlage, auf der eine neuroprotektive Wirkung auch beim retinalen IRI vermutet werden kann und sich in dieser Untersuchung bestätigt hat.

Bei den vorangegangenen Untersuchungen ist jedoch die Gabe der Betulinsäure lediglich *vor* der Induktion des IRI erfolgt. Unklar bleiben hier die Auswirkungen einer Gabe nach dem Eintreten der Schädigung. Dies ist in Hinblick auf die Anwendung der Betulinsäure als Therapeutikum beim Menschen insofern ungünstig, da der Zeitpunkt eines IRI beim Menschen nicht vorausgesehen werden kann. Daher wäre eine Dauermedikation z.B. bei Risikopatienten nötig, um die Ergebnisse aus den Tierversuchen zu übertragbar zu machen. Hierbei würden jedoch Patienten mit einem retinalen IRI, die zuvor kein entsprechendes Risikoprofil für eine solche Dauermedikation aufwiesen, nicht von der protektiven Wirkung der Betulinsäure profitieren können. Ebenso kann es Risikopatienten geben, die keinen retinalen IRI erleiden und somit daher bezüglich dieser Schädigung nicht von der Betulinsäure profitieren (wenngleich die Patienten sich über das Ausbleiben des IRI freuen dürften). Eine solche Dauermedikation (ohne Eintreten eines retinalen IRI) würde dann aufgrund der potentiellen (Arzneimittel-) Interaktionen und Minderung der Compliance bei steigender Komplexität der Medikation (310) ein mögliches Risiko darstellen, dessen Vermeidung wünschenswert wäre. Unter diesen Gesichtspunkten sind die möglichen Effekte einer Gabe der Betulinsäure *nach* dem Eintreten des retinalen IRI besonders interessant. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Arbeiten wird die Betulinsäure in dieser Arbeit sowohl am Vortag als auch über sieben Tage nach der Induktion des retinalen IRI gegeben. Damit werden erstmals *in vivo* sowohl die Effekte einer prä- als auch einer postinterventionellen Gabe erfasst. Die Wirksamkeit der Betulinsäure wird damit im Hinblick auf ihren Nutzen beim retinalen IRI umfassender geprüft, da erstmals die postinterventionellen Effekte berücksichtigt werden.

2. Auswirkungen der Betulinsäure auf die Anzahl der Neurone in der

Ganglienzellschicht und auf die Anzahl retinaler Ganglienzellen beim retinalen IRI

In der Kontrollgruppe (Trägersubstanz) kommt es nach acht Tagen Reperfusion in der Ganglienzellschicht (GCL, *engl. ganglion cell layer*) zu einem Abfall der Anzahl retinaler Neurone allgemein und der retinalen Ganglienzellen (RGC, *engl. retinal ganglion cells*) im Speziellen, wohingegen kein signifikanter Verlust in der Behandlungsgruppe festgestellt werden kann. Dies spricht für eine protektive Wirkung der Betulinsäure.

In den Flachpräparaten fallen in der GCL neben RGC vor allem auch verlagerte Amakrinzellen (dAC, *displaced amacrine cells*) (220) unter die erfassten Neurone, da diese Zelltypen in neuronalen (Standard-)Färbungen nicht zu unterscheiden (284, 311) und verschobene Horizontalzellen in der GCL eher selten sind (312).

Der dAC-Anteil kann bei Ratten (201) und Mäusen (220) über 50% der Neuronen in der GCL ausmachen. Welches Gewicht die dAC in der menschlichen Retina haben, ist hingegen nicht eindeutig: Neufeld und Kollegen (201) beschreiben ein vereinzelt Auftreten von dAC (morphologisch). Die Arbeitsgruppe von Curcio (221) gibt jedoch an, dass ihr Anteil zwischen 3% (Area centralis) und 70% (Ora serrata) variiert. Bei anderen Primaten (*Alouatta caraya*) machen die dAC in der GCL auch knapp 50% aus und weisen ein ähnliches Verteilungsmuster wie in der humanen Retina auf (312). In der Zusammenschau erscheint daher die Annahme eines substanziellen dAC-Anteils an den Neuronen in der GCL beim Menschen kohärent. Die dAC scheinen am Sehvorgang modulierend beteiligt zu sein (220).

Beim retinalen IRI gehen vermutlich durch ähnliche Mechanismen sowohl RGC als auch Amakrinzellen verloren (9, 14, 232). Die hier bei einem retinalen IRI beobachtete Reduktion der Anzahl von Neuronen in der GCL der Kontrollgruppe stimmt demnach mit den Erwartungen überein und betrifft wahrscheinlich beide Zellpopulationen, ebenso wie die beschriebene protektive Wirkung der Betulinsäure.

Der RGC-Verlust wurde außerdem separat erfasst und bestätigt den erwarteten Verlust durch den IRI sowie den Erhalt dieser Neuronen unter Betulinsäure.

Der RGC-Verlust infolge des retinalen IRI führt zu einer Minderung des Visus (8, 9). Auch ein Verlust von dAC könnte das Sehvermögen beeinträchtigen, wenngleich noch unklar ist, wie sich dies im Detail auswirkt. Insgesamt scheint es jedoch wahrscheinlich, dass durch die Gabe von Betulinsäure auch ein besserer Visus nach retinalem IRI erzielt werden kann. Die an anderen Organen beschriebene protektive Wirkung der Betulinsäure beim IRI (253, 269, 307-309) tritt also auch in der Retina auf.

3. Auswirkungen der Betulinsäure auf den oxidativen Stress beim retinalen IRI

Nach Beginn der Reperfusion kommt es schnell und somit früh zu einem starken Anstieg der ROS-Produktion (24, 50, 127, 170, 313), aber oxidativer Stress ist ebenso ein wichtiges Element der Neuroinflammation (14), welche zu den späten Ereignissen des IRI zählt (20, 21) (siehe auch II.1.3, II.1.3.2, II.1.4). Daher ist das Ausmaß der ROS-Produktion nach acht Tagen Reperfusion interessant und durch die zeitgleiche Bestimmung der mRNA-Level können erste Rückschlüsse auf potentiell beteiligte Enzyme gezogen werden.

Hier wird die Färbung von Schnittpräparaten der Retina mit Dihydroethidium (DHE) genutzt, um oxidativen Stress nachzuweisen. Die DHE-Färbung zur Bestimmung des (relativen) ROS-Gehalts wird überwiegend innerhalb der ersten 24 Stunden der Reperfusion an Präparaten des Gehirns (280), der Retina (51, 64, 141, 314-317) sowie anderer Organe (Niere, Myokard) (318-321) oder Gewebe (Skelettmuskel) (322) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sprechen für eine erhöhte ROS-Produktion in der Retina während dieser frühen Reperfusion (51, 316, 317), aber liefern keine Erwartungswerte für den achten postischämischen Tag. Zwei Arbeitsgruppen haben allerdings zu einem späteren Zeitpunkt die DHE-Färbung eingesetzt. Sie stellen auch in der gesamten Retina (homogenisiert) nach fünf Tagen (275) sowie in der Perinfarktregion des zerebralen Apoplex nach ein und zwei Wochen (121) Reperfusion signifikant erhöhte Fluoreszenzintensitäten als Marker für oxidativen Stress fest. Die hiesige Arbeit findet jedoch keinen Anhalt für langfristig erhöhte ROS-Konzentrationen in der Ganglienzellschicht (GCL) nach retinalem IRI. Möglicherweise ist die ROS-Produktion während der initialen Reperfusion gesteigert, aber zum Zeitpunkt der Messung so weit abgefallen, dass die vorhandene Fallzahl (n=7 pro Gruppe) nicht ausreicht, um signifikante Unterschiede festzustellen. Dieser Abfall könnte durch den Verlust von Neuronen in der GCL wie retinalen Ganglienzellen (RGC) als Folge des IRI zustande kommen: RGC sind aufgrund ihrer langen und metabolisch kostspieligen Axone besonders empfindlich gegenüber IRI (9) und enthalten viele Mitochondrien (69), welche in stoffwechselaktiven Geweben eine wichtige ROS-Quelle beim IRI darstellen (24). Hierdurch könnte bereits früh während der Reperfusion intensiver oxidativer Stress in den RGC entstehen. Es scheint plausibel, dass insbesondere solche Zellen, die durch ihre eigene ROS-Produktion intensivem oxidativem Stress ausgesetzt sein könnten, geringere Überlebenschancen haben. Das Absterben von RGC ist in der Kontrollgruppe beobachtet und könnte

konsekutiv eine Reduktion der ROS-Produktion und eine Verminderung des oxidativen Stresses in der GCL nachsichziehen.

Die beiden Studien, die langfristig erhöhten oxidativen Stress nachweisen konnten, sind weniger spezifisch bezüglich dessen Lokalisation: in der Retina wird nicht die nur die parazentrale GCL, sondern die homogenisierte Retina als Ganzes betrachtet (275). Hierin sind auch Zellen enthalten, die vermutlich weniger empfindlich als die RGC in der GCL gegenüber IRI sind. Auch die Studie des zerebralen IRI betrachtet mit der Perinfarktregion Gewebe, das von den Auswirkungen der Ischämie nicht in vollem Ausmaß betroffen ist (121). Durch die verschiedenen Intensitäten des IRI und Sensitivitäten der untersuchten Gewebe könnte die Diskrepanz der Ergebnisse zustande kommen.

Es bleibt jedoch unklar, warum sich die beobachtete Induktion der prooxidativen NOX2 in den ischämischen Retinae nicht auch auf das Ausmaß des oxidativen Stresses niederschlägt. Einerseits könnte dies an der Nachweismethode liegen, andererseits ist auch denkbar, dass die erhöhten mRNA-Level der NOX2 nicht mit einer erhöhten Aktivität einhergehen. Anstelle der DHE-Färbung hätten auch direkte Nachweismethoden für ROS (125) oder die Erfassung von Auswirkungen des oxidativen Stresses auf bestimmte Zellbestandteile (8-Hydroxyguanosin (99), Malondialdehyd (170)) eingesetzt werden können. Jedoch hat der direkte Nachweis Nachteile (146, 299) und bei der Erfassung oxidativer Veränderungen müssen zeitliche Ungenauigkeiten bei der Zusammenschau mit der Genexpression in Kauf genommen werden. Daher kann hier festgehalten werden, dass mit der verwendeten DHE-Färbung kein oxidativer Stress nach dem retinalen IRI festgestellt wird. Die vorliegende NOX2-Induktion erscheint hierzu auf den ersten Blick inkongruent, kann aber möglicherweise auf die fehlende Übertragung der erhöhten mRNA-Level auf eine erhöhte Aktivität oder auch die gewählte Nachweismethode für ROS bzw. die gewählte Lokalisation der Untersuchung zurückgeführt werden.

4. Auswirkungen der Betulinsäure auf die Genexpression zentraler Enzyme beim retinalen IRI

Die Analyse der postinterventionellen mRNA-Level bestimmter Enzyme kann zu einem besseren Verständnis der längerfristigen Veränderungen der Genexpression beim retinalen IRI und dem Einfluss der Betulinsäure hierauf beitragen. Hierdurch können einige Mechanismen, die der Wirkung der Betulinsäure zugrundeliegen, möglicherweise genauer beleuchtet werden.

Die hierfür betrachteten Enzyme sind als Akteure und Gegenspieler in die Pathomechanismen des retinalen (und zerebralen) IRI involviert und beeinflussen dementsprechend das Geschehen auf protektive und schädliche Weise, wie im Folgenden dargestellt. Dabei wird in Gruppen von Enzymfamilien auf die Wirkung der jeweiligen Enzyme beim retinalen IRI, die erwarteten Veränderungen der Genexpression und der Einfluss der Betulinsäure auf ihre Expression eingegangen. Die CAT, GPX1 und HO1 bilden zwar keine Enzymfamilie werden aber aus funktionellen Gründen gemeinsam dargestellt.

4.1 Die NADPH-Oxidasen (NOX)

Die Enzyme der NOX-Familie produzieren $O_2^{\cdot-}$ bzw. H_2O_2 (47, 49, 59) und gehören im Kontext des zerebralen und retinalen IRI allgemein zu den prooxidativen Enzymen (21, 24, 51). Während die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion unter physiologischen Bedingungen keine oxidativen Schäden an der Zelle verursacht (59), scheint sie im Rahmen von Ischämien im Nervengewebe, wie dem Gehirn oder auch der Retina an Zellschädigungen durch ROS beteiligt zu sein (121, 122, 129). Insbesondere die NOX2 sollte beim zerebralen und retinalen IRI mit Neuroinflammation hervorgehoben werden (7, 46, 51, 99), auch wenn die NOX1 die vorherrschende Isoform in der Retina zu sein scheint (122) und die genauen Rollen der NOX1, NOX2 und NOX4 noch nicht abschließend geklärt sind (50). Hypoxie, ein Begleitumstand des IRI, scheint alle drei NOX-Isoformen zu regulieren und zu einem Anstieg ihrer mRNA- und Proteinkonzentrationen zu führen (127).

4.1.1 NOX und ihre Wirkung beim retinalen IRI

Die Wirkung der NOX1 scheint beim IRI mit einer Neurotoxizität einherzugehen, welche in ihrer Abwesenheit signifikant geringer ausfällt: im Gehirn von Ratten (Wistar) und Mäusen (C57BL/6N) sind bei einem Knockout/-down der NOX1 das Infarktvolumen nach 24 Stunden (Ratten) bzw. vier Wochen (Maus) und die Funktionseinbußen geringer im Vergleich zum Wildtyp (121, 323).

Die zugrundeliegenden Mechanismen, über jene die Schädigung des Gewebes durch die NOX1 vermittelt werden könnte, ist noch nicht eindeutig geklärt. Denkbar sind direkte neurotoxische Wirkungen der produzierten ROS auf Zellbestandteile und Signalkaskaden (siehe II.2.3). Auch scheint eine Verbindung zur mitochondrialen ROS-Produktion zu bestehen (24, 122), welche durch die NOX1 verstärkt wird (24) und ihrerseits die Induktion der NOX1 fördern kann (in nicht-neuronalen Zellen) (121). Wenngleich das Ausmaß dieses Effekts unklar ist, scheint hierüber eine wechselseitige Verstärkung denkbar zu sein.

Da auch die zerebrale Astrozytenaktivierung ohne die NOX1 postischämisch vermindert ist (121), sind Verbindungen zur Neuroinflammation zu vermuten. Hierauf scheint auch das Vorkommen von Bindungsstellen für NF- κ B im Promoter der NOX1 hinzudeuten (46), da dieser Transkriptionsfaktor wesentlich für die Entzündungsreaktion ist [(89)und siehe auch II.1.4].

Möglicherweise wird außerdem die eNOS in ihrer Funktion gestört, da die NOX1 in glatten Muskelzellen von Gefäßen (47, 49) sowie retinalen Perizyten (116) und auch zerebralen Endothelzellen (323) nachgewiesen ist. Begünstigt durch die räumliche Nähe könnten sowohl die Entkopplung der eNOS durch oxidative Veränderung von BH₄, als auch die Bildung von ONOO⁻ begünstigt werden (48). Es gibt jedoch Untersuchungen, die dieser Hypothese widersprechen (127, 323), sodass diese Frage noch offen ist.

Somit ist es denkbar, dass die prooxidative NOX1 auch über andere ROS-Quellen (Mitochondrien, ucNOS) die Entstehung von oxidativem Stress fördert und darüber hinaus möglicherweise proinflammatorisch und ungünstig auf den Vasotonus wirkt.

Die NOX2 scheint eine zentrale Rolle beim retinalen oder zerebralen IRI zu spielen (7, 46, 51, 99) und ist in verschiedene Pathomechanismen involviert (siehe II.2.3.2).

Verschiedene Untersuchungen weisen dabei auf einen schädlichen Einfluss der NOX2 beim IRI hin (24, 31, 50, 51): ein Mangel oder Knockout des Enzyms geht beim zerebralen (46, 50, 121) oder retinalen (51, 122) IRI mit geringeren Schädigungen einher und scheint daher protektiv zu sein.

Die aktivierte NOX2 hat verglichen mit ihren Isoformen NOX1 oder NOX4 eine größere $O_2^{\cdot-}$ -Produktion (49). Neben den direkten schädigenden Effekten der ROS auf verschiedene Zellbestandteile (siehe II.2.3), ist die NOX2 vermutlich in die Blut-Hirn-Schrankenstörung (31, 50), die Glutamatergische Exzitotoxizität (31, 53), und die postischämische Entzündung (50, 51) involviert:

Die Verbindung zur Exzitotoxizität besteht über den NMDA-Rezeptor, da die NOX2 in Neuronen hierüber aktiviert werden kann (31, 121). Sie stellt die Hauptquelle der ROS-Produktion durch NMDA-Rezeptorstimulation dar (53).

Bezüglich der Neuroinflammation scheint sie an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt zu sein, der zerebral und retinal vermutlich wesentlich für den Tod von Neuronen ist (51). Hinzu kommt, dass sowohl die Aktivierung von Gliazellen in der Retina (51), als auch die gesamte zerebrale Entzündungsreaktion (50) bei fehlender NOX2 geringer ausfällt. Ein weiterer Punkt ist das Vorkommen der NOX2 in Leukozyten: ihre hohe Syntheseleistung kann als sogenannter „respiratory/oxidative burst“ in Phagozyten auftreten (46, 129). Zu diesen Zellen zählen Leukozyten, welche die IR-geschädigten Retina infiltrieren (62, 87) und einen relevanten Anteil der Schädigung auszumachen scheinen (24, 50): bei Leukopenie oder Hemmung der Leukozytenadhäsion ist das Ausmaß des IRI geringer (50), wenngleich das Wirkspektrum der infiltrierenden Leukozyten über die reine Aktivierung der NOX2 hinausgeht (siehe II.2.4).

Außerdem ist auch hier eine Beeinflussung der Perfusionsverhältnisse während der Reperfusion denkbar: die NOX2 ist wie die NOX1 in retinalen Perizyten (50), sowie allgemein in Endothelzellen (47) enthalten, wodurch eine Vasokonstriktion bei Reoxygenierung durch $O_2^{\cdot-}$ und eine Komprimittierung der NO-Produktion (47) im Rahmen der Reperfusion plausibel sind.

Die NOX2 könnte demnach eine mögliche Querverbindung zwischen oxidativem Stress, Exzitotoxizität und Neuroinflammation darstellen und über eine Beteiligung an diesen schädigenden Prozessen, nebst einer potentiellen Beeinflussung der Perfusion und Blut-Retina-Schranke, hierdurch ihre neurotoxische Wirkung während des retinalen IRI entfalten.

Die NOX4 unterscheidet sich von der NOX1 und NOX2 durch eine (nennenswerte) konstitutive Aktivität (50) und ihr Produkt, da sie vorwiegend H_2O_2 anstelle von $O_2^{\cdot-}$ produziert [siehe II.3.1.3 oder (46, 49, 50, 128)]. Jedoch werden ihr ebenfalls (wenigstens von einigen Quellen) im Kontext des zerebralen (31, 121, 324) oder retinalen (13) IRI schädliche Effekte zugeschrieben.

So trägt die NOX4 in der Retina durch Komplexbildung mit dem Toll-like-Rezeptor 4 vermutlich zur Bildung von ROS, RNS und Zytokinen bei (13). Allgemeiner scheint zerebral sowohl das Knockout der NOX4 beim IRI (324, 325) oder chronischer Ischämie (324) als auch ihre Hemmung hierbei (120, 253) protektiv zu sein.

Es sollte jedoch im Hinterkopf behalten werden, dass diese Beobachtungen von anderen Gruppen nicht bestätigt werden konnten (50) und der NOX4 auch protektive Wirkungen zugeschrieben werden: hierzu gehören Verbindungen zu antioxidativen Mechanismen (119, 120, 326) und mögliche günstige Effekte auf die Perfusion (118-120), auf die weiter unten (siehe V.4.1.3) eingegangen wird. Der exakte Stellenwert und die möglichen Wirkungen der NOX4 beim zerebralen (und retinalen) IRI werden zwar diskutiert, aber eine Beteiligung am Geschehen ist aufgrund der vorhandenen Evidenz wahrscheinlich.

4.1.2 NOX - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI

In-vitro-Experimente zeigen einen Anstieg der NOX1-mRNA in verschiedenen retinalen Zelltypen (RGC, Mikroglia-, Müllerzellen) innerhalb von vier bis 16 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (7). Im In-vitro-Modell des retinalen IRI (OGD) an RGC von Mäusen findet sich ebenfalls eine gesteigerte Expression der NOX1 nach einstündiger Reoxygenierung und einer Normalisierung des mRNA-Levels innerhalb von drei Stunden (122). Ähnlich wie in der Retina ist die mRNA der NOX1 auch bei zerebralen Zellkulturen von Mäusen in diversen Zelltypen (zerebrale Endothelzellen, Mikroglia, Astrozyten, Neurone) auffindbar (323).

Die vorhandene Literatur zu In-vivo-Untersuchungen des IRI an Ratten und Mäusen spiegelt diese Ergebnisse wider: das Protein der NOX1 liegt bei Mäusen (C57BL/6J) in der Retina per se und auch nach drei Stunden Reperfusion vor (122). Beim zerebralen IRI von Ratten finden sich erhöhte NOX1-Proteinkonzentrationen in der Penumbra, die bis zu 14 Tage postischämisch nachgewiesen werden können (121).

Die Aktivität der NOX1 kann innerhalb von Minuten durch Stimuli wie Angiotensin II (46, 47, 129) oder IFN- γ (59, 124) gesteigert oder mittels Induktion (124) z.B. über NF- κ B (46) verstärkt werden. Auch scheinen mitochondriale ROS sowohl die Aktivität als auch die Genexpression der NOX1 zu steigern (129). Da sowohl ROS (30, 99) als auch eine vermehrte Aktivität bzw. ein verstärktes Auftreten von NF- κ B beim retinalen IRI (51, 273, 327) beobachtet worden sind, stellen diese eine mögliche Grundlage für die beschriebene verstärkte Expression dar.

Die bisherigen Daten verweisen damit insgesamt auf eine gesteigerte Genexpression der NOX1 beim (retinalen) IRI. Diese Annahme konnte in der hiesigen Untersuchung jedoch auf dem Niveau der mRNA nicht bestätigt werden.

Eine denkbare Ursache für die abweichenden Ergebnisse stellen der Untersuchungszeitpunkt sowie Abweichungen im Studiendesign dar: die In-vitro-Daten von Mäusen sprechen für einen eher kurzen Anstieg der Transkription und der Proteinkonzentrationen von etwa drei Stunden Reperfusion (122).

Die Langzeitdaten (14 Tage) stammen von Untersuchungen an der Penumbra in Gehirnen von Ratten (Wistar) (121). Die geringere Schädigung in der Penumbra könnte über ein erhöhtes Überleben von NOX1-haltigen Zellen zu der hier fehlenden Signifikanz führen. Möglicherweise ist der Nachweis der erhöhten NOX1-Expression nach acht Tagen Reperfusion nicht mehr über die mRNA, aber über ihre Proteinkonzentrationen möglich, wenngleich die In-vitro-Daten von Mäusen dem widersprechen. Allerdings kann natürlich auch die Spezies ein Einflussfaktor sein, der für einen anderen zeitlichen Ablauf der Genexpression bei Ratten und Mäusen sorgt. Plausibel erscheint es, dass es im Rahmen des IRI zu einer eher kurzzeitig gesteigerten Transkription der NOX1 kommt, die nach einer oder zwei Wochen nicht über ihre mRNA-Level nachweisbar ist.

Zur NOX2 ist bekannt, dass ihre Genexpression beim zerebralen oder retinalen IRI sowie Umständen, die hiermit einhergehen (Hypoxie, Fehlen von Glucose) verstärkt zu werden scheint: In vitro kommt es in retinalen Mikroglia (Ratte) unter Hypoxie (7) und in RGC (Maus) (122) sowie retinalen Astrozyten (Maus) (99) im In-vitro-Modell des IRI (OGD) zu erhöhten mRNA-Leveln der NOX2. Auch in vivo ist bei Mäusen (C57BL/6J) in der Retina dieser mRNA-Anstieg nach sechs (4, 51, 328) und zwölf Stunden (51) verzeichnet. Hinzu kommt, dass auch das NOX2-Protein beim retinalen IRI erhöht vorliegt (51) und sich die Induktion der mRNA somit auf weitere Ebenen der Expression auszuwirken scheint.

Auch Untersuchungen des zerebralen IRI kommen zu ähnlichen Ergebnissen, da hier angehobene mRNA-Level (50, 127), Proteinkonzentrationen (50, 121, 127) und Aktivitäten (31) der NOX2 im ischämischen Gebiet sowie der Penumbra beschrieben sind. Im Gegensatz zur Retina, wo eine Untersuchung die Normalisierung der mRNA- und Proteinkonzentrationen nach 48 Stunden feststellt (51), sind in einigen Gehirnregionen (Cortex, Striatum) auch nach sieben Tagen gesteigerte mRNA- (127) und Proteinkonzentrationen (121) vermerkt worden.

Insgesamt sprechen die vorliegenden Daten aus der Literatur für die Erwartung einer verstärkten Transkription der NOX2. Das zeitliche Ausmaß dieser Induktion ist im Gehirn ausführlicher untersucht, als in der Retina und spricht für eine längerfristige Beteiligung der NOX2 am IRI.

Die erwartete Induktion der NOX2 im Rahmen des retinalen IRI hat sich in dieser Untersuchung sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe bestätigt und somit als längerfristig erwiesen. Dies passt insbesondere zu den Ergebnissen aus Untersuchungen des zerebralen IRI. Der beschriebene Abfall retinaler mRNA-Level der NOX2 könnte möglicherweise auf einen zeitlichen Verlauf mit mehreren Phasen gesteigerter Transkription hinweisen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Beteiligung verschiedener Transkriptionsfaktor sein: zu den Induktoren der NOX2 gehören neben IFN- γ , Angiotensin II auch Gewebsverletzungen (Myokardinfarkt) (46, 124) und vermutlich die Reperfusion selbst (50). Unter den relevanten Transkriptionsfaktoren ist neben NF- κ B auch PU.1 wichtig, der mehrere Elemente des NOX-Gesamtkomplexes (NOX2, p47phox, p67phox) induziert (46). PU.1 könnte neben der bekannten Aktivierung von NF- κ B (siehe II.3.1.2), ebenfalls an der beschriebenen Induktion der NOX2 beteiligt sein, da PU.1 (Protein) nach hypoxischer Schädigung des ansteigt und auch nach einer Woche noch erhöht nachweisbar ist (329). Die Grundlage für eine mögliche Beteiligung von PU.1 an der NOX2-Exprimierung beim (zerebralen) IRI ist damit gegeben.

Beim zerebralen IRI ist während der Reperfusion auch mit erhöhten mRNA- (50, 253, 269, 324) und Proteinkonzentrationen (50, 324) der NOX4 zu rechnen. Auch für den retinalen IRI gibt es Hinweise aus In-vitro-(7) und In-vivo-(13)-Untersuchungen, die für eine erhöhte Expression der NOX4 bei diesem Verletzungstypen sprechen, wenngleich dieser Nachweis auch in beiden Ansätzen (in vitro/vivo) ausbleiben kann (51, 122).

Auch hier konnte in der Kontrollgruppe keine erhöhte Genexpression der NOX4 festgestellt werden und passt damit zu den bisherigen Ergebnissen aus der Retina (7, 51, 122). Da eine Hypoxie die Transkription der NOX4 lediglich in retinalen Mikrogliazellen, aber nicht in RGC oder Müllerzellen zu stimulieren scheint (7), könnte ein zu geringer Anteil dieser Zellen zur fehlenden Signifikanz führen. Außerdem fehlen Erkenntnisse über die Bedeutung der NOX4 in retinalen Gefäßen. Gefäße sind im Allgemeinen eine wichtige Lokalisation der NOX4 (siehe II.3.1.3) und in zerebralen Gefäßen ist die NOX4-Konzentration deutlich höher als in der Aorta (50). Darüber hinaus steigt die NOX4-Expression sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen

nach dem IRI an (50). Wenn dieses Phänomen in der Retina geringer ausfällt, könnte dies ebenfalls zur Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus der Retina und dem Gehirn beitragen. Letztendlich lässt sich aber auch der Beobachtungszeitpunkt oder -parameter (mRNA statt Protein, Aktivität) analog zur NOX1 nicht als Erklärungsmöglichkeit ausschließen, wenngleich die NOX4-Aktivität vorrangig über die Transkription reguliert wird (47, 49).

Grundlagen für die erwartete Induktion der NOX4 sind wie bei ihren Isoformen das beschriebene Ansprechen auf Hypoxie (127) über HIF-1 α (192) oder die Stimulation durch NF- κ B (330). Da allerdings auch andere Enzyme auf diese Stimuli (46, 127) ansprechen sollten und deren mRNA-Level hier gleichfalls keine Veränderungen am achten Reperfusionstag aufweisen, scheinen diese Faktoren nicht ausschlaggebend zu sein. Für die gesteigerte NOX2-Expression gibt es aufgrund einer möglichen Beteiligung von PU.1 eine alternative Erklärung ohne Beteiligung von NF- κ B.

4.1.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die NOX - Expression beim (retinalen) IRI

Da die Betulinsäure den Transkriptionsfaktor NF- κ B hemmt (98, 235, 237, 243, 251, 257, 264, 269), der gegebenenfalls zur postischämischen Induktion der hier relevanten NOX-Isoformen (46) beitragen kann, präsentiert sie sich als geeignete pharmakologische Substanz, um einen Anstieg der NOX-Expression zu verringern.

Es ließ sich jedoch kein signifikanter Einfluss der Betulinsäure auf die Genexpression der NOX1 oder NOX2 feststellen. Dies deutet darauf hin, dass es keinen langfristigen Effekt der Betulinsäure auf diese beiden Enzyme gibt. Für die NOX1 ist aus einer Untersuchung von Lu und Kollegen (269) beim zerebralen IRI zudem auch kein frühzeitiger Einfluss der Betulinsäure auf die Genexpression der NOX1 bekannt.

Jedoch ist dort eine Hemmung der auftretenden NOX2-Induktion nach 22 Stunden Reperfusion beim zerebralen IRI in vivo durch die perorale Gabe von Betulinsäure gezeigt worden (269). Dieser Effekt der Betulinsäure lässt sich hier nach acht Tagen Reperfusion in der Retina nicht nachweisen. Die zu diesem Zeitpunkt relevanten (Transkriptions-)Faktoren scheinen demnach nicht von der Betulinsäure beeinflusst zu werden. Wenngleich also eine Hemmung der NOX2 durch die Betulinsäure in der frühen Reperfusion zu ihren protektiven Wirkungen zählen könnte (269), ist dies kein Langzeiteffekt, der zur Neuroprotektion beiträgt.

Die NOX4 hingegen scheint beim retinalen IRI durch die orale Gabe von Betulinsäure induziert zu werden. Diese Beobachtung widerspricht In-vitro-Untersuchungen der

Betulinsäure an Kulturen aus Endothel- (HUVEC) (208) oder insulinproduzierenden Zellen (BRIN-BD11) (331) und Ergebnissen zur peroralen Gabe der Betulinsäure in vivo beim zerebralen IRI, die allesamt eine verminderte Induktion der NOX4 nach 24 und 72 Stunden verzeichnen (253). Jedoch sind die bisherigen Ergebnisse nicht gänzlich kongruent, da eine frühere Untersuchung einer dieser Arbeitsgemeinschaften die oben beschriebene Hemmung nach 22 Stunden Reperfusion im gleichen Ansatz nicht festhalten konnte (269).

Die In-vitro-Daten stützen zwar den Rückschluss auf einen hemmenden Einfluss der Betulinsäure auf die NOX4-Expression beim zerebralen (und damit vermutlich auch retinalen) IRI, jedoch fehlen in den Zellkulturstudien die pathophysiologischen Auswirkungen des IRI im Zusammenhang mit der Betulinsäure. Auch bei den Studien in vivo wurde die Betulinsäure präinterventionell verabreicht, also vorwiegend während eines Zeitintervalls, in dem besagte pathophysiologische Prozesse noch nicht angestoßen worden sind. Demnach ist es denkbar, dass bei den früheren Studien die Wirkung der Betulinsäure unter physiologischen Bedingungen überwiegt, wohingegen hier die längerfristige Gabe der Betulinsäure nach IRI zu anderen Ergebnissen kommt. Durch die Betulinsäure ist sowohl eine Hemmung von NF- κ B (237, 243), als auch die Verstärkung von PPAR- γ -Signalwegen (243) möglich. Das zu erwartende Ergebnis dieser beiden Prozesse ist eine reduzierte NOX4-Aktivität (59) bzw. -Expression (46), wie sie nach kurzzeitiger Reperfusion zerebral auch beobachtet wurde (253). Durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 könnte es hingegen zu einer NOX4-Induktion unter Betulinsäure kommen, da Betulinsäure die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors zu steigern scheint (332) und im NOX4-Promoter passende Bindungsstellen vorhanden sind. Nrf2 scheint in vitro an der NOX4-Transkription sowohl basal als auch bei oxidativem Stress durch Hyperoxie beteiligt zu sein (330). Die Arbeitsgruppe um Kovac (333) vermutet eine Einflussnahme des Nrf2 auf die NOX4 durch die Modulation von Histondeacetylasen, über welche ein (kontinuierlich) aktiver Nrf2 die NOX4-Genexpression fördern könnte. Damit erscheint es plausibel, dass die Betulinsäure über Nrf2 einen induzierenden Effekt auf die Genexpression der NOX4 in der Retina auswirken könnte.

Jedoch scheint die Beeinflussung der NOX4 durch Nrf2 weniger gut verstanden, als die Wirkung der NOX4 auf Nrf2: Die NOX4 begünstigt vermutlich die Aktivierung von Nrf2 über oxidative Veränderungen des Nrf2-Inhibitors Keap1 (119, 326) und möglicherweise des Repressors Bach1 (61). Dieser wechselseitige Einfluss könnte zu positivem Feedback zwischen Nrf2 und NOX4 führen. Die parallele Transkription

diverser antioxidativer Zielgene von Nrf2 (siehe unten), könnte oxidativer Stress infolge einer überschießenden NOX4-Aktivität verhindern und als negatives Feedback fungieren.

Es ist jedoch noch unklar, ob die Betulinsäure Nrf2 aktivieren und hierüber die NOX4 induzieren kann oder ob die Induktion der NOX4 die Aktivierung von Nrf2 nach sich zieht. Auch eine positive Feedback-Schleife ist nicht auszuschließen.

Aus verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen am Retina, Gehirn und Myokard gibt es Hinweise auf einen protektiven Einfluss einer Nrf2-Aktivierung bei IRI (334-336) sowie eine vermehrte Aktivität unter Triterpenoiden im Allgemeinen (195, 334) sowie unter Betulinsäure im Speziellen (67) (in vitro und in vivo).

Zusammengefasst ist damit einerseits denkbar, dass die Betulinsäure unter physiologischen Verhältnissen eine andere Wirkung auf die NOX4-Expression hat, als bei den pathophysiologischen Reaktionen eines retinalen IRI. Andererseits könnte man annehmen, dass es aufgrund verschiedener Transkriptionsfaktoren o.ä. zu einem biphasischen Verlauf der NOX4-Expression unter Betulinsäure mit spätem Anstieg kommt. Der Zelltyp könnte zudem einen Einfluss besitzen, wenngleich er bei In-vivo-Studien nicht im Einzelnen berücksichtigt werden kann. Weitere Untersuchungen zur Klärung dieser Diskrepanz erscheinen damit, insbesondere unter der Berücksichtigung des Transkriptionsfaktor Nrf2, sinnvoll.

Die signifikant erhöhte Expression der ROS-produzierenden NOX4 in den ischämischen Retinae der Gruppe unter Betulinsäure scheint jedoch mit der beobachteten Neuroprotektion unter Betulinsäure beim retinalen IRI zu disharmonieren. Die wahrscheinlich durch die NOX4-Induktion erhöhte ROS-Produktion (337) kann einerseits eine unerwünschte Nebenwirkung darstellen, wenngleich die protektive Wirkung der Betulinsäure nicht fatal beeinträchtigt wird. Andererseits gibt es insbesondere von Studien kardiovaskulärer Erkrankungen auch Hinweise auf protektive Effekte der NOX4. Diese könnten zur protektiven Gesamtwirkung der Betulinsäure beitragen und sollen im Folgenden genauer ausgeführt werden.

So bestehen mehrere günstige Effekte auf die NO-Produktion: die NOX4 kann die Aktivität und Expression der eNOS steigern (118-120). Außerdem scheint die Bioverfügbarkeit des NO nicht durch die Bildung von ONOO⁻ und konsekutiver Entkopplung der NOS gemindert zu werden (118-120), da das Produkt der NOX4 H₂O₂

(anstelle von $O_2^{\cdot-}$) ist (118, 192). Dies könnte die Ursache dafür, dass bei einer Überexpression der NOX4 im Gegensatz zur NOX1 oder NOX2 keine endotheliale Dysfunktion auftritt (118, 119), wenngleich H_2O_2 auch ein potentieller NOS-Inhibitor ist (119).

Zudem hat H_2O_2 einen vasodilatierenden Effekt (118-120), der insbesondere an zerebralen Gefäßen wirkungsvoll ist (118). Somit könnte die Perfusion auf der Basis einer Vasodilatation über NO oder H_2O_2 auch in der Retina durch die NOX4 verbessert werden.

Des Weiteren besteht eine Verbindung der NOX4 zu antioxidativen Elementen, wie dem bereits erwähnten Transkriptionsfaktor Nrf2 (119, 120, 326) und GSH (326). Nrf2 reagiert auf den Redox-Status der Zelle (192, 326) und scheint über die NOX4 aktiviert (119, 326) und vermehrt exprimiert zu werden (120, 326). Zu den Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors zählen verschiedene antioxidativ wirkende Enzyme. Allen voran findet sich hier die HO1 (119, 192), aber vermutlich auch die SOD1-3 (108) und die CAT (163). Darüber hinaus scheint auch die mitochondriale Funktion günstig beeinflusst zu werden (192). Zu den wichtigen nicht-enzymatischen Antioxidantien zählt GSH (siehe II.2.3), dessen Synthese in vitro bei fehlender NOX4 gestört zu sein scheint (326). Über diese Mechanismen könnte die NOX4 neben den Effekten auf die Perfusion auch (indirekte) antioxidative Eigenschaften besitzen.

Weiterhin scheint ein Mangel der NOX4 beim renalen IRI proapoptotisch zu wirken (326). Auch Schröder und Kollegen (119) stellen die Hypothese auf, dass die NOX4 im Gefäßsystem einen protektiven Gegenpol zu ihren Isoformen NOX1 und NOX2 bildet. Die NOX4 könnte demnach auch über antioxidative, vasodilatierende und möglicherweise antiapoptotische Wirkungen verfügen und zur Neuroprotektion durch die Betulinsäure beitragen.

Diesen Hypothesen gegenüber stehen Studien des zerebralen IRI, bei denen sich ein Knockout oder eine Hemmung der NOX4 als günstig erwiesen hat (253, 324, 325). Möglicherweise spielt hier das Vorhandensein einer rigiden Umhüllung des betroffenen Gewebes eine entscheidende Rolle, da diese beim Gehirn als Kalotte vorhanden ist, aber bei Retina und Niere fehlt. So ist zerebral insbesondere bei jüngeren Patienten die Entwicklung massiver Ödeme nach Mediainfarkt beschrieben (338). Auch im experimentellen Ansatz wird ein Gefäßverschluss oft an eher jungen Versuchstieren durchgeführt (253, 280, 324), sodass dieses Phänomen hier Berücksichtigung verdient. Durch das Hirnödem kommt es zu einem erhöhten intrakraniellen Druck, der

die Perfusion beeinträchtigt und akut unter anderem mittels einer *Vasokonstriktion* durch Hyperventilation gesenkt werden kann (338). Zu den postulierten protektiven Effekten der NOX4 gehören jedoch verschiedene Mechanismen, die zu einer *Vasodilatation* führen (siehe oben). Letztere könnte der Vasokonstriktion/-spasmus des No-Reflow-Phänomens nach dem IRI entgegenwirken (23, 40, 179) und auch in der Untersuchung des renalen IRI (326) günstige Effekte vermittelt haben. Im Falle des zerebralen IRI ist diese Vasodilatation jedoch aufgrund des (gesteigerten) intrakraniellen Druckes mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation ungünstig (14). Es ist daher denkbar, dass durch das Ausschalten der NOX4 beim zerebralen IRI eine Reduktion des postischämischen intrakraniellen Drucks durch eine verminderte Vasodilatation erreicht und so auch das Ausmaß des IRI eingedämmt werden kann. Der Retina fehlt jedoch wie der Niere die knöchernen Kalotte und eine Ausdehnung in Richtung des Glaskörpers ist möglich. Daher ist die Steigerung des Gewebedrucks verglichen mit dem Gehirn deutlich geringer und fällt auch für die Prognose weniger ins Gewicht (14). Somit könnte die rigide Kalotte die Diskrepanz der Ergebnisse erklären und eine potentielle NOX4-vermittelte Vasodilatation mit gesteigerter Perfusion der Retina sich hier indes als günstig erweisen.

Generell ist das Bild der NOX4-Funktion aufgrund der inkongruenten Ergebnisse beim IRI jedoch noch nicht eindeutig. So sind zwar protektive Wirkungen durch eine Induktion der NOX4 beim retinalen IRI denkbar und eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zum zerebralen IRI ist vorhanden, dennoch steht das Auftreten der NOX4-Induktion als unerwünschte Nebenwirkung als plausible alternative Sichtweise im Raum. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, in welche Richtung sich die Waagschale für die NOX4 letztendlich neigt und ob sie Teil der protektiven Wirkung, ein Rädchen im Wirkmechanismus oder eine unerwünschte Nebenwirkung der Betulinsäure ist.

4.2 Die Superoxiddismutasen (SOD)

Die SOD katalysieren die Dismutation (72, 133, 134) von Hydroperoxid ($O_2^{\cdot-}$) zum weniger toxischen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (56, 57), wodurch der weitere Abbau über die CAT und GPX1 möglich wird (136). Sie gehören zu den wichtigsten protektiven Elementen bei oxidativem Stress (siehe II.2.3). Die SOD1 scheint zwar den häufigsten Vertreter der SOD in der Retina darzustellen (139, 140), jedoch kann jeder Isoform ein subzelluläres Kompartiment zugeordnet werden, in welchem sie den

Hauptvertreter repräsentiert und entscheidend zum antioxidativen Schutz beiträgt (siehe II.3.2.1-3).

4.2.1 SOD und ihre Wirkung beim retinalen IRI

Die SOD1 hat ihre Hauptlokalisierung im Zytosol, wenngleich sie auch in anderen Kompartimenten auftritt (siehe II.3.2.1). Die vorhandene Evidenz spricht dafür, dass die SOD1 im Rahmen von IR-Ereignissen – auch bei einer Überexpression – eine protektive Rolle innehat. In der Retina wurde die SOD1 als wichtigster Schutzfaktor gegen ROS postuliert (84). Ihr Fehlen führt hier auch ohne andere Pathologien zu einer Dysfunktion im Elektroretinogramm (139). Auch hat sie bei Einzelaspekten des IRI, wie der Exzitotoxizität und oxidativen Stress protektive Wirkungen gezeigt, da im Knockoutmodell nach diesen Phänomenen vermehrt oxidative Schäden, eine erhöhte Zelltodrate und eine beeinträchtigte Retinafunktion vorliegen (33, 142).

Auch beim zerebralen IRI wirkt sie neuroprotektiv (142) und verringert in transgenen Tieren mit verstärkter Expression das Ausmaß der Schädigung (80, 156, 176). In ihrer Abwesenheit fällt das Infarktvolume hingegen größer aus (339). Auch im Gehirn scheinen insbesondere die Exzitotoxizität und Störung der Blut-Hirn-Schranke, aber auch oxidative Schädigungen sowie das Ausmaß der Apoptose durch die SOD1 vermindert zu werden (80, 339). Zudem wird vermutlich die NOX2-Expression beim IRI durch die SOD1 reduziert (53).

Zusammengefasst scheint die protektive Gesamtwirkung der SOD1 und der Erhalt der Retinafunktion beim IRI neben den antioxidativen und möglichen antiapoptotischen Effekten, auch durch ein verringertes Ausmaß der Exzitotoxizität und einer geringeren Schrankenstörung zustande zu kommen.

Die SOD2 ist das wichtigste Antioxidans in den Mitochondrien (53, 72, 73) und wirkt protektiv gegen den postschämischen Anstieg der (mitochondrialen) ROS-Produktion (70). Dies zeigt sich sowohl im Gehirn als auch in der Retina: ein SOD2-Knockdown vergrößert das Ausmaß des zerebralen IRI, beispielsweise sichtbar an einem größeren Infarktvolume (53, 146). Eine Überexpression der SOD2 oder der Einsatz eines SOD2-Mimetikums sind jedoch mit einer geringeren Schädigung verbunden (53, 143). Diese neuroprotektive Wirkung lässt sich auch an der Retina nachweisen, wo die Überexpression der SOD2 bei chronischen sowie akuten IOP-Erhöhungen das Überleben der RGC verbessert und die oxidativen Schäden an Zellbestandteilen reduziert (79, 141, 275, 279). Neben der antioxidativen Wirkung dürften auch die antiapoptotischen Effekte (53, 70, 73) zur protektiven Wirkung der SOD2 beitragen.

Dementsprechend wäre eine pharmakologische Induktion der SOD2 als wünschenswerter Effekt beim retinalen IRI zu werten (148).

Die SOD3 ist ein weiteres protektives Element beim IRI, da dieses Enzym sowohl die (extrazellulären) $O_2^{\cdot-}$ -Konzentrationen vermindert, als auch zur Regeneration des ischämischen Gewebes beiträgt (71, 72). Aufgrund ihrer Lokalisation im Extrazellularraum fördert die SOD3 besonders die Bioverfügbarkeit von NO (72, 104, 154) und hat damit mutmaßlich positive Effekte auf die Perfusion.

Ihre Gesamtwirkung im Kontext des IRI und verwandten Phänomenen ist an verschiedenen Organen (101, 103), darunter auch insbesondere das Gehirn, untersucht worden. Eine Überexpression der SOD3 geht aufgrund ihrer neuroprotektiven und antiinflammatorischen Eigenschaften mit einem günstigeren Ergebnis zerebraler IRI oder chronischer zerebraler Hypoxien einher (154, 340, 341). Eine SOD3-Defizienz führt hingegen zu vermehrten zerebralen Schädigungen bei IR-Ereignissen (86). Da die Rolle der SOD3 beim retinalen IRI bisher nicht (explizit) untersucht wurde, muss mit einer Extrapolation der Erkenntnisse aus zerebralen IRI vorliebgenommen werden. Aufgrund der antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkungen der SOD3 sowie der besseren NO-Bioverfügbarkeit wird daher auch beim retinalen IRI ein protektiver Einfluss der SOD3 angenommen.

4.2.2 SOD - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI

Die SOD werden beim IRI häufig gemeinsam erfasst. Hierfür wird ihre Gesamtkonzentration (tSOD-Aktivität) gemessen, die keine konkreten Rückschlüsse auf die einzelnen Isoformen zulässt, aber immerhin einen ersten Gesamteindruck liefert. Diese tSOD-Aktivität ist bei oxidativem Stress in der Retina (13) oder Schädigung derselben durch einen entfernten IRI (*remote IRI*) (342) vermindert. Auch der retinale (2) oder zerebrale (343) IRI scheinen zu einer geringeren Aktivität zu führen, wenngleich widersprüchliche Daten hierzu existieren (344). Weiterhin ist bei septischen Entzündungen, die ebenfalls mit oxidativem Stress einhergehen, diese verringerte tSOD-Aktivität in pulmonalem und renalem Gewebe beschrieben (264, 270). Trotz nicht gänzlich kongruenter Daten kann daher von einer verminderten tSOD-Aktivität bei Entitäten, die mit oxidativem Stress verbunden sind, ausgegangen werden.

Wahrscheinlich sinkt demnach die Genexpression mindestens einer SOD-Isoform ab, wenngleich deren Identität bei Betrachtung der Gesamtkonzentration im Dunkeln bleibt.

Die zu erwartenden Auswirkungen des IRI selbst auf die mRNA-Level der SOD1 sind nicht eindeutig, da in der Retina in der Reperfusionphase sowohl gleichbleibende

(136), als auch gesteigerte (148, 345) und verminderte (346) mRNA- oder Proteinkonzentrationen festgestellt werden konnten. Auch im Gehirn ist neben einer unveränderten (339), gleichfalls eine verminderte (347) Genexpression der SOD1 beschrieben worden. Die zu erwartenden Veränderungen der SOD1 bei einem retinalen IRI sind damit unklar.

Der Fall der SOD2 ist hingegen etwas eindeutiger. Es werden zwar neben Abnahmen (53, 70, 79, 85, 275) in der Retina, dem Gehirn sowie peripheren Geweben, auch Anstiege im Myokard (73) oder der Retina (279) oder fehlende signifikanten Veränderungen (136, 148) der Expression oder Aktivität im Kontext des IRI verzeichnet, jedoch spricht das Gesamtbild am Ehesten für eine verminderte Genexpression. Diese könnte durch oxidative Veränderungen des stimulierenden Transkriptionsfaktors STAT3 zustande kommen (53), wenngleich postischämisch auftretende Zytokine (u.a. TNF- α , IFN- γ , IL-1) induzierend wirken (70, 92).

Für die SOD3 hingegen ist die Situation ähnlich der SOD1. Auch hier finden sich widersprüchliche Beschreibungen einer verminderten postischämischen Aktivität im Gehirn nach IRI (348) oder der Akkumulation der SOD3 an betroffenen Gefäße innerhalb von 24 Stunden mit nachfolgend verstärkter Genexpression in den zerebralen Neuronen (349, 350). Unter einer chronischen Hypoxie (154) und unter Zytokinen scheint es z.B. über NF- κ B zu einer Induktion zu kommen (92, 103, 104).

Für den retinalen IRI sind noch keine Veränderungen der SOD3 beschrieben, aber der Einfluss von oxidativem Stress ist untersucht worden. Leider sind auch diese Beobachtungen nicht kongruent. Einerseits wird in vitro eine gehemmte SOD3-Transkription in retinalen Perizyten beschrieben (152) und andererseits in vivo eine SOD3-Induktion in der Retina (351) mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Demnach liefert die Literatur auch für die Expression der SOD3 beim retinalen IRI keine sinnvolle Voraussage.

Damit tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zum differenzierten Verständnis des Einflusses eines retinalen IRI auf die Genexpression der SOD bei. Es kann kein langfristiger Einfluss des IRI allein festgehalten werden. Wenn der Verlust der SOD-Gesamtaktivität beim IRI auf verringerte mRNA-Level zurückgeht, fällt dies möglicherweise in eine frühe Phase der Reperfusion. Alternativ kann die Veränderung der tSOD-Aktivität aber natürlich auch Ursachen haben, die nicht auf dem Niveau der Transkription liegen und anhand der mRNA-Level daher nicht nachweisbar sind.

4.2.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die SOD - Expression beim (retinalen) IRI

Die Betulinsäure scheint bei verschiedenen pathologischen Entitäten, die mit oxidativem Stress einhergehen, in einer Vielzahl von Organen und Zelltypen einen Einfluss auf die SOD zu haben und den Abfall ihrer Gesamtaktivität aufzuhalten (248, 252, 257, 264, 265, 270). Dieser Effekt der Betulinsäure scheint allerdings vom Vorliegen oxidativen Stresses abhängig zu sein und in seiner Abwesenheit zu fehlen (209). Diese Untersuchung betrachtet erstmals die Auswirkungen der Betulinsäure auf alle drei Isoformen beim IRI differenziert. Lediglich über die Wechselwirkung der Betulinsäure mit der SOD2 in der Leber konnten bereits Erkenntnisse aus anderen Kontexten gewonnen werden (siehe unten).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Betulinsäure bei einem retinalen IRI die SOD1 und SOD3 zu induzieren scheint, während die SOD2 nicht signifikant verändert ist. Dies führt zur Vermutung, dass die oben beschriebene Erhaltung der tSOD-Aktivität unter Betulinsäure auf den Isoformen SOD1 und SOD3 beruhen könnte.

Die Isoformen teilen sich einige gemeinsame Transkriptionsfaktoren, zu denen neben AP-1 [*engl. activator protein 1* (23)], AP-2 und Sp-1 [*engl. activating protein 2 bzw. engl. specificity protein 1* (104)] auch NF- κ B (104, 108) gehört. Während eine Hemmung von NF- κ B durch die Betulinsäure beschrieben ist (235, 237, 243, 255), scheint AP-1 von ihr hingegen nicht beeinflusst zu werden (352). Über potentielle Wechselwirkungen mit AP-2 ist bisher nichts bekannt. Ähnlich dem NF- κ B ist auch in Bezug auf Sp-1 in verschiedenen Tumorzelllinien eine gehemmte Expression oder Wirkung (353-357) von Sp-1 unter Betulinsäure geschildert worden. Damit scheiden diese gemeinsamen Transkriptionsfaktoren als induzierende Effektoren der Betulinsäure wahrscheinlich aus – wenngleich die Betulinsäure auf Tumorgewebe im Vergleich zu nicht-malignem Gewebe andere Wirkungen haben kann, wie es anhand der Apoptose beschrieben ist [Vgl. (236, 243, 244) und (235, 236)].

Ein weiterer Kandidat zur Vermittlung der Betulinsäurewirkung aus den Reihen der Transkriptionsfaktoren ist CCAAT-Enhancer-Binding Protein β (C/EBP- β), das sowohl die SOD1 als auch die SOD3 beeinflusst (92, 104). Damit scheint die selektive Einflussnahme der Betulinsäure über diesen Transkriptionsfaktor auf den ersten Blick möglich.

Allerdings ist die Induktion des zerebral normalerweise nur marginal vorhandene C/EBP- β auch ohne die Gabe von Betulinsäure beim zerebralen IRI in Mäusen (C57B/6) beschrieben und es wird eine Beteiligung an der postischämischen

Neuroinflammation angenommen (358). Daher würde man bei einem relevanten Einfluss von C/EBP- β eher in der Kontrollgruppe eine SOD1- und SOD3-Induktion erwarten, die hier aber ausbleibt.

Weiterhin hat sich die Betulinsäure als Inhibitor der C/EBP-Familie herausgestellt, dessen Effektivität insbesondere für den Transkriptionsfaktor C/EBP- β in zwei verschiedenen Ansätzen nachgewiesen ist (352). Da Betulinsäure als C/EBP- β -Inhibitor eingesetzt werden kann (359), scheint es unwahrscheinlich, dass die Betulinsäure-vermittelte Induktion der SOD1 und -3 über C/EBP- β zustande kommen könnte.

Erneut bietet sich der Transkriptionsfaktor Nrf2 als passendes Puzzlestück an, um das Gesamtbild zu vervollständigen: alle drei SOD-Isoformen weisen AREs im Promotor auf (108). Demnach liegen Bindungsstellen für Nrf2 vor (siehe II.3.3.3), der unter Betulinsäure im Kern zu akkumulieren und vermehrt aktiv zu sein scheint (332). Eine durch die Betulinsäure verursachte Induktion der SOD1 bis 3 über Nrf2 ist demnach plausibel. Aus aktuellen Untersuchungen des zerebralen IRI (und den Auswirkungen eines Monoterpenoids) scheint wenigstens eine teilweise Vermittlung einer Induktion der SOD über Nrf2 wahrscheinlich (334).

Dass diese Wirkung die SOD2 auszusparen scheint, könnte an einer separaten Interaktion dieser Isoform mit der Betulinsäure liegen. Die Expression der SOD2 wird in Tumorzellen und bei einer Hepatitis-B-Infektion in nicht-malignen Zellen der Leber durch die Betulinsäure gehemmt. Im Falle eines Hepatozellulären Karzinoms sind hierin eine Induktion des Proteins p53 und die microRNA-21 involviert (360). Ob dies auch in nicht-malignen Zellen auftritt ist (noch) nicht bekannt. In Hepatozyten ist bei entzündlichen Bedingungen (Hepatitis-B-Infektion) unter Betulinsäure die Hemmung des cAMP-Response Element Binding Proteins (CREB) durch eine Dephosphorylierung beschrieben (361). CREB gehört zu den induzierenden Transkriptionsfaktoren der SOD2 (361), die beim IRI ansteigen können (358). Das dephosphorylierte CREB kann hemmend wirken (361) und stört vielleicht die Nrf2-Wirkung, da ihre Bindungsstellen in einem ähnlichen Promotorbereich liegen (361). Daher erscheint es legitim anzunehmen, dass sich unter Betulinsäure die Induktion (über Nrf2) und die Hemmung der SOD2-Transkription die Waage halten können oder die Induktion zeitlich begrenzt ist, sodass die Genexpression am achten Tag der Reperfusion unverändert ist, während ihre Isoformen SOD1 und SOD3 über Nrf2 induziert werden.

4.3 Die Katalase, Glutathionperoxidase-1 und Hämoxxygenase

Die CAT, GPX1 und HO1 stellen keine gemeinsame Enzymfamilie dar, allerdings dienen die CAT und GPX1 beide dem Abbau von H_2O_2 zu Wasser und auch die HO1 wirkt über ihre Abbauprodukte antioxidativ, sodass sie hier gemeinsam dargestellt werden (siehe II.3.3.1-3). Die CAT und GPX1 gehen von einem gemeinsamen Substrat aus. Es wird aber angenommen, dass die GPX1 bei physiologischen (niedrigen) H_2O_2 -Konzentrationen den größeren Anteil des H_2O_2 -Abbaus übernimmt (179) und die CAT vor allem bei höheren Konzentrationen eine wichtige Rolle spielt (109), da die H_2O_2 -Affinität der GPX1 viel höher, als die der CAT ist (55, 90).

4.3.1 Die CAT, GPX1 sowie HO1 und ihre Wirkung beim retinalen IRI

Die CAT wirkt als starkes Antioxidans protektiv gegen oxidative Schädigungen (109, 159, 160, 163, 168), auch im Rahmen des IRI (141). Abgesehen hiervon werden neurodegenerative Prozesse sowie die Apoptose hemmend beeinflusst (160, 163). Eine gentechnisch erzielte Überexpression der CAT hat sich im Nervengewebe allgemein und in der Retina als günstig für das Ergebnis nach IRI erwiesen (141, 166, 170). Sie gehört damit aufgrund ihrer antioxidativen, antiapoptotischen und antidegenerativen Wirkungen ebenfalls zu den neuroprotektiven Elementen beim retinalen IRI, deren Induktion zu befürworten zu sein scheint.

Die protektive Wirkung der GPX1 hat vielfältige Entfaltungsmöglichkeiten, da neben dem Abbau von H_2O_2 und dem Schutz vor oxidativen Schäden, auch eine Hemmung der Apoptose und (Neuro-) Inflammation sowie mutmaßlich eine Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke über dieses Enzym zustande kommen können (75, 82, 90, 91, 111, 112, 156, 179). Die Auswirkungen auf den nitrosativen Stress sind hingegen uneindeutig, da zwar die Umsetzung von ONOO^- in silico simulierbar (178) und in vitro auch die Bildung von Nitrit aus ONOO^- beschrieben ist (180), jedoch Ergebnisse anderer Untersuchungen in vitro und in vivo im Widerspruch zu dieser Hypothese stehen. So gibt es Beobachtungen, dass die GPX1 nitrosativen Stress zu verstärken bzw. ein Knockout der GPX1 vor nitrosativen Stress zu schützen scheint (75, 82, 177). Nichtsdestotrotz vermindern die vielzähligen protektiven Wirkungen der GPX1 das Ausmaß des IRI: eine Überexpression der GPX1 führt nachweislich zu Abmilderung des IRI im Gehirn (und anderen Geweben) (90, 91), wohingegen sich das Fehlen des Enzyms nachteilig auszuwirken scheint (74, 90, 100, 111, 175, 179). Eine generelle Überexpression der GPX1 kann aufgrund beobachteter metabolischer Auswirkungen (Insulinresistenz, Adipositas; siehe II.3.3.2) und des Risikos von reduktivem Stress

(z.B. fehlende Wachstumsstimuli) (74, 93) nicht per se unter physiologischen Bedingungen befürwortet werden. Beim IRI und dem damit verbundenen oxidativen Stress stellt dies jedoch ein wünschenswertes therapeutisches Ziel dar (74, 94).

Die HO1 nimmt eine zentrale Rolle unter den (antioxidativen) Schutzmechanismen ein und wurde zudem kürzlich von einigen Autoren als Schlüsselenzym in der Therapie des IRI bezeichnet (62, 362).

Im Einzelnen wirkt die HO1 bzw. ihre Produkte antioxidativ (61, 63, 88, 181, 188, 189, 191), antinitrosativ (95, 182), antiinflammatorisch (61, 64, 65, 87, 88, 97, 167), antiapoptotisch (61, 88, 95, 182), antiproliferativ (65, 191) und wahrscheinlich günstig auf die (postischämische) Mikrozirkulation (83, 95, 107, 181, 186).

Dabei wird angenommen, dass die Endprodukte der HO1, insbesondere CO und Biliverdin bzw. Bilirubin die zytoprotektiven Wirkungen vermitteln, auch wenn die entsprechenden Mechanismen nur teilweise bekannt sind (66). Die genannten Produkte haben sich auch als Einzelkomponenten beim IRI als protektiv erwiesen: so konnten sowohl exogen zugeführtem Biliverdin (35mg/kg KGW) als auch CO eine Reduktion des IRI bzw. der Schädigung durch eine permanente Ischämie in Gehirnarealen nachgewiesen werden (81, 97). Außerdem stimuliert CO vermutlich die Genexpression über den bereits erwähnten Transkriptionsfaktor Nrf2 (61, 81). Die Aktivierung von Nrf2 ist insbesondere für die Expression der HO1 wichtig und kann den Verlauf zerebraler IRI günstig beeinflussen (113). Neben der HO1 selbst werden auch die SOD-Familie (81) und die CAT (163) über Nrf2 stimuliert. Passend zu dieser Wirkung von CO auf Nrf2 wurde beim IRI im Rückenmark festgestellt, dass die Gabe von HO1 auch mit einem teilweisen Erhalt der SOD1- sowie der CAT-Aktivitäten einhergeht (167). Somit erscheint es denkbar, dass die verstärkte Expression weiterer Antioxidantien zur antioxidativen Wirkung der HO1 beiträgt. Die beobachtete Inhibition der postischämischen HO1-Induktion im Gehirn durch Biliverdin (97) widerspricht dieser Annahme nicht zwingend, sondern könnte einen Kontrollmechanismus darstellen, der das Risiko reduktiven Stresses mindert. Passend hierzu zeigt sich, dass die Gabe von Bilirubin in höherer Dosis (100mg/kg KGW vgl. Bilirubin 35mg/kg KGW) beim renalen IRI schädliche Auswirkungen hat (363). Eine ausschließlich positive Verstärkung der HO1-Expression führte vermutlich beim IRI zu negativen Folgen, sodass auch hier zu gelten scheint:

„allein die Dosis machts, dass ein Ding kein Gift sei.“⁷

⁷ Nach Paracelsus (1493 – 1541)

In der Retina ist die Stimulation der HO1-Aktivität mit günstigen Auswirkungen auf einen IRI assoziiert, da verschiedene in diesem Kontext protektive Substanzen – wenigstens teilweise – über die HO1 zu wirken scheinen (62, 64, 83, 188, 364). Auch im Gehirn scheint die Induktion der HO1 ein Wirkmechanismus diverser protektiver Substanzen zu sein, die zur Therapie des zerebralen IRI untersucht werden (107). Darüber hinaus ist diese Neuroprotektion beim IRI durch einen gentechnisch oder pharmakologisch herbeigeführten Anstieg der HO1-Expression in verschiedenen neuronalen Geweben beschrieben (83, 97, 113, 167, 188).

In der Retina geht die pharmakologische Induktion der HO1 beim IRI mit erhöhten Überlebensraten von RGC einher (83, 188). Der Wirkungsbereich der HO1 scheint dabei nicht auf die Zellen beschränkt, in denen sie induziert wird, sondern auch das umliegende neuronale Gewebe zu schützen (63, 87). Auch die Verminderung oxidativer und nitrosativer Schäden in retinalen Endothelzellen durch eine überexprimierte HO1 könnte neben der Vasodilatation durch CO (107, 182) zum Erhalt der Mikrozirkulation und damit zum generellem Schutz des Gewebes beitragen (63). Zusammengefasst sind die protektiven Effekte der HO1-Induktion also auch im Kontext des retinalen IRI bereits beobachtet und als wünschenswertes (pharmakologisches) Ziel postuliert worden (62-64, 83, 87, 188, 364).

4.3.2 CAT-, GPX1-, HO1-Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI

Die Ergebnisse aus der Literatur scheinen in Bezug auf die Veränderung der CAT beim IRI von Neuronen allgemein bzw. der Retina im Speziellen konsistent darin, dass es zu einem Abfall der CAT-Aktivität oder -Expression kommt (136, 141, 167, 170), auch bei indirekten IR-Schäden (342). Zu den möglichen Mechanismen zählen verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression der CAT bei Mensch und Maus beeinflussen und humorale Faktoren. Beispielsweise wirkt der Faktor Wilms Tumor 1 (über die Bindung von Sp1) inhibitorisch auf die Genexpression (163), aber auch eine längerfristige Exposition gegenüber ROS (109, 161) sowie verschiedene Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) (109, 110), die postischämisch in der Retina auftreten (siehe II.2.4), wirken dämpfend auf die Enzymaktivität der CAT. Weiterhin scheint NO, das überschießend vor allem von der nNOS und iNOS beim IRI freigesetzt werden kann (siehe V.4.4.1), zu einer reversiblen Hemmung der CAT beizutragen (110). Es sind demnach diverse Mechanismen denkbar, über die eine verminderten CAT-Expression und -Aktivität beim IRI entstehen können.

IR-Ereignisse im Gehirn und der Retina beeinflussen die GPX1 ebenfalls. Es scheint beim retinalen IRI nach 24 Stunden zu einem Anstieg ihrer mRNA-Level zu kommen (136, 148), wenngleich die verfügbaren, differenzierten Quellen zu dieser spezifischen Isoform aus der GPX-Familie sehr überschaubar sind. Bei Betrachtungen der GPX-Gesamtaktivität in anderen Organen (Milz, Leber) unter pathologischen Bedingungen, die mit oxidativem Stress einhergehen, sind Abfälle der GPX-Gesamtaktivität beschrieben (257, 265). Aber auch hier sind natürlich keine Rückschlüsse auf die verantwortliche/n Isoform/en möglich. Bezüglich der GPX1-Expression beim retinalen IRI erscheint die vorab beschriebene Induktion daher wahrscheinlicher, wenngleich unsicher aufgrund der wenigen Quellen.

Für die HO1 ist die Datenlage besser. So wird im Gehirn und der Retina, sowie in weiteren Geweben infolge von IR-Ereignissen zumeist zu einer vermehrten HO1-Genexpression festgehalten (65, 87, 148), wenngleich nicht immer signifikante Veränderungen des HO1-Proteins festgestellt werden (64, 364). Auch ein erhöhter intraokularer Druck führt in vivo in der Retina (und in vitro in RGC) zu einem Anstieg der HO1-Proteinmenge (187).

Eine Induktion der HO1 und der GPX1 und eine reduzierte Expression der CAT scheinen demnach als Folge des retinalen IRI wahrscheinlich. Hier können in der Kontrollgruppe allerdings keine signifikanten Veränderungen der Expressionen dieser Enzyme festgestellt werden. Möglicherweise fällt auch hier die Signifikanz dem zeitlichen Verlauf oder erfassten Parameter zum Opfer. Allerdings lässt sich daraus schließen, dass die beschriebenen Veränderungen ihrer Expressionen infolge retinaler IRI auf dem mRNA-Level kein Langzeiteffekt zu sein scheinen.

4.3.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die Expression der CAT, GPX1 und HO1 beim (retinalen) IRI

Zu den Auswirkungen der Betulinsäure auf die Genexpression der CAT, GPX1 und HO1 gibt es nur überschaubare Erkenntnisse aus der Literatur. Insbesondere für die GPX1 liegen nur indirekte Daten vor, da lediglich die Gesamtaktivität aller GPX unter Betulinsäure betrachtet wurde (257, 265). Hierdurch bleibt im Unklaren, ob die gemessene Aktivität oder Expression tatsächlich auf die GPX1 oder doch auf eine andere Isoform zurückzuführen ist. Allerdings spricht die bisherige Evidenz dafür, dass die Betulinsäure im Allgemeinen die Genexpression der CAT (265, 365), GPX (265) und HO1 (332) sowie die Aktivitäten der CAT und GPX (Gesamtaktivität) steigert (250).

Auf diverse pathologische Entitäten, bei denen oxidativer Stress eine wichtige Rolle spielt und veränderte Expressionen oder Aktivitäten antioxidativer Enzyme hervorrufen kann, scheint die Betulinsäure ebenfalls einen positiven Einfluss zu haben: so wird ein Abfall der GPX-Gesamtaktivität in der Leber und in Splenozyten unter Betulinsäure gemindert (257, 265). Es ist zwar denkbar, dass auch die GPX1 hieran beteiligt ist, aber die hiesigen Ergebnisse unterstützen diese Annahme nicht. Auch spricht der niedrige Rang der GPX1 in der Hierarchie der Selenoproteine (74, 93) gegen eine solche Beteiligung. Die Expression bzw. Aktivität der GPX1 ist bereits bei moderaten Selenkonzentrationen aufgrund einer reduzierten mRNA-Stabilität eingeschränkt (74, 93, 112, 177) und ein Abfall der Selenverfügbarkeit kann im Rahmen einer Entzündungsreaktion zustande kommen (366), wie sie postischämisch auch in der Retina auftritt (siehe II.2.4).

Die bereits eingeführten von der Betulinsäure beeinflussten Transkriptionsfaktoren NF- κ B, PU.1 und Nrf2 sind auch für die GPX1-Expression relevant (74). Jedoch stellt sich die Frage, ob diese Wirkung ins Gewicht fällt, wenn die mRNA-Stabilität während der Reperfusion beeinträchtigt ist. Somit könnte dieser Faktor die mutmaßlich stimulierende Wirkung der Betulinsäure auf die GPX1-Expression stören und zu einem Abfall dieses Enzyms bei Selenmangel führen. Wahrscheinlicher scheint daher, dass eine andere GPX-Isoform für die im Vergleich erhöhte GPX-Gesamtaktivität unter Betulinsäure verantwortlich ist.

Die oben angeführte Stimulation der GPX-Gesamtaktivität unter Betulinsäure tritt in Splenozyten sowie der Leber auf (257, 265). Obgleich die Isoform GPX2 vorwiegend in intestinalen Epithelzellen lokalisiert ist (93, 94, 111), scheint sie diese Beobachtungen erklären zu können. Erstens kommt sie bei verschiedenen Spezies (Mensch, Maus, Ratte) in der Leber (366-368) und Milz (369, 370) vor oder kann dort induziert werden. Zweitens ist sie ein Zielgen (74, 93) des Betulinsäure-empfindlichen Nrf2 (332). Drittens werden diese potentiellen Auswirkungen der Betulinsäure auf die GPX2-Expression, anders als bei der GPX1, durch eine Entzündungsreaktion vermutlich nicht gestört: sowohl ein Selenmangel (74) als auch proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-6 in Hepatozyten) (366) scheinen sich eher stimulierend auf ihre Exprimierung auszuwirken. Dies macht die GPX2 zu einer plausibleren Erklärung für die beschriebene Wirkung der Betulinsäure auf die GPX-Gesamtaktivität.

Diese Erkenntnisse bezüglich der „intestinalen GPX“, wie die GPX2 auch genannt wird (93), sind auch für den retinalen IRI relevant, da die GPX2 in ähnlich hohen Konzentrationen wie die GPX1 und GPX4 in der Retina von Mäusen (mit albinotischem

Hintergrund, SV129xBALBc/CF1) nachgewiesen wurde (371). Zudem konnte die Induktion der GPX2 in der Retina von Ratten unter Protonenstrahlung ausgelöst werden (351). Dieses Expressionsniveau und Verhalten in der Retina, sprechen dafür, dass die GPX2 eine interessante Rolle in der Retina und beim retinalen IRI spielen könnte. Leider gibt es bisher kaum Untersuchungen zu dieser Isoform in der Retina, die jedoch gerade bezüglich der Wirkung von Betulinsäure beim retinalen IRI mehr Beachtung zu verdienen scheint.

Auch die CAT wird unter Betulinsäure bei entzündlichen Prozessen in diversen Organen (Leber, Lunge, Pleura, Niere) verstärkt exprimiert (372) oder erleidet einen geringeren Verlust ihrer Aktivität (257, 264, 270). Im Widerspruch hierzu steht die Beobachtung, dass unter Isofluran in neonatalen Neuronen die Expression der CAT sowie die neurotoxische Wirkung des Isoflurans bei einer Gabe von Betulinsäure verringert werden (251). Möglicherweise beeinflusst der Entwicklungsgrad der Zellen die Wirkung der Betulinsäure auf die CAT-Expression oder -Aktivität unter Stressbedingungen.

Die Induktion der CAT durch Betulinsäure ist in den hiesigen Daten nicht nachweisbar. Die CAT wird wie die NOX4 von PPAR γ in ihrer Genexpression beeinflusst, allerdings wirkt PPAR γ hier fördernd (109, 163, 169). Hiervon abgesehen findet sich unter den Transkriptionsfaktoren der CAT der stimulierende Nrf2 und das hemmende mTOR (163). Während auf PPAR γ nur ein indirekter stimulierender Einfluss der Betulinsäure (über den Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ Koaktivator 1) besteht (243), sind in vitro sowohl eine verminderte mTOR-Expression (243), als auch eine Akkumulation von Nrf2 im Zellkern (332) unter Betulinsäure beschrieben. Somit könnten alle genannten Transkriptionsfaktoren eine Induktion der CAT unter Betulinsäure erklären. Möglicherweise sind diese Effekte jedoch abhängig vom Zelltyp oder in vivo geringer ausgeprägt, sodass bei der hiesigen Untersuchung der CAT-Expression beim retinalen IRI in vivo das Signifikanzniveau für die Betulinsäure verfehlt wurde.

Im Falle der HO1 zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit hingegen, dass es unter Betulinsäure beim IRI zu einer Induktion des Enzyms kommt. Dieser Effekt ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben: in vitro kommt es in Makrophagen (264.7RAW) unter Betulinsäure zu einer gesteigerten Expression der HO1 (332). Auch in vivo ist im Kontext bestimmter Nephropathien, bei denen oxidativer Stress wichtig ist, von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen die Wirkung der Betulinsäure betrachtet

und ein stimulierender Effekt auf die HO1-Expression festgestellt worden (373, 374) bzw. eine Wirkungsvermittlung via Nrf2 im Kontext entzündlicher Prozesse (67).

Die hier zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher erst im Ansatz untersucht, da die HO1 von vielen Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden beeinflusst wird. Hierzu zählt allen voran Nrf2, aber es fallen auch AP-1, NF- κ B (62, 107) und der AMP-Kinase-Signalweg (88) darunter. Wie bereits erwähnt besteht vermutlich kein Einfluss der Betulinsäure auf AP-1, während NF- κ B durch sie gehemmt wird (siehe V.4.2.3), sodass diese Transkriptionsfaktoren als Mediatoren der Betulinsäure ausscheiden. Nrf2 hingegen scheint sich sowohl bei den In-vitro- (332), als auch In-vivo-Untersuchungen (373, 374) eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung für den Effekt der Betulinsäure auf die HO1-Expression anzubieten. Es ist in und ex vivo jedoch auch eine Aktivierung der AMP-Kinase durch die Betulinsäure beobachtet worden (243), sodass dieser Mechanismus als mögliche Erklärung nicht gänzlich außer Acht gelassen werden sollte.

4.4 Die NO-Synthasen (NOS)

Die NOS sind NO-produzierende Enzyme, die durch eine Entkopplung dieser Synthese jedoch zu einer wichtigen ROS-Quelle werden können. Die drei Isoformen haben verschiedene Hauptlokalisationen und sind an der Modulation der neuronalen Transmission (nNOS), Entzündungsprozessen (iNOS) und der Regulation des Vasotonus (eNOS) beteiligt (siehe II.3.4.1-3).

4.4.1 NOS und ihre Wirkung beim retinalen IRI

Die Wirkung von NO auf die Retina oder das Gehirn bei einem IRI ist abhängig von seiner Quelle (199, 375-377). Während die eNOS über eine Förderung der Perfusion insgesamt einen protektiven Effekt zu haben scheint (199, 343, 377, 378), weisen die nNOS (199, 343, 375, 378) und iNOS (199, 343) schädliche Wirkungen auf.

Das von der nNOS freigesetzte NO wirkt beim retinalen und zerebralen IRI neurotoxisch (199, 343, 375, 377) und scheint einen Teil des exzitotoxischen Effekts von Glutamat im Rahmen des IRI auszumachen (277, 313, 378, 379): durch die Stimulation des NMDA-Rezeptors kommt es zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welche die calciumabhängige nNOS aktivieren kann (35, 38, 313, 375). Die nNOS produziert unter physiologischen Bedingungen wie die eNOS NO in eher niedrigen Konzentrationen (48, 197), jedoch liegen die maximalen

Reaktionsgeschwindigkeiten von nNOS und iNOS deutlich höher als die der eNOS (105). Auch scheint die nNOS eine größere Neigung zur Entkopplung und Produktion von $O_2^{\cdot-}$ als die eNOS aufzuweisen (203). Diese Überproduktion von NO durch die iNOS und nNOS sowie die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ durch die Entkopplung führen zu toxischen NO-Konzentrationen (199, 343) und der Entstehung von $ONOO^-$ (14, 25). Dies kann eine mitochondrialen Dysfunktion (14, 38, 343), DNA-Schädigungen (14) [erkennbar an der vermutlich konsekutiven Aktivierung von Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (38, 379)] und die Bildung von Nitrotyrosin (14, 380) nach sich ziehen.

In der Retina ist die Hemmung der nNOS mit einer Reduktion des IRI assoziiert (313, 375, 377), solange die Perfusion nicht durch die unspezifische Hemmung aller NOS beeinträchtigt wird (377). Auch Ergebnisse von zerebralen IRI zeigen, dass ein Knockout (199, 378, 379) oder die Hemmung der nNOS (199, 343, 378, 380) – auch hier unter Berücksichtigung der Perfusion (378, 380) – protektiv wirken.

Die iNOS übertrifft ihre Isoformen in ihrer NO-Produktion quantitativ und zeitlich (24, 35, 105, 212, 230). Durch die Abhängigkeit dieser Produktion von der Proteinbiosynthese des Enzyms kommt es jedoch erst zeitlich verzögert (105, 198, 226, 229) zum Einsetzen ihrer zytotoxischen NO-Produktion (24, 105, 212, 231). Als Teil der Immunabwehr ist dies durch das Abtöten pathologischer Mikroorganismen förderlich (35, 114), als Teil der (sterilen) Neuroinflammation nach zerebralen oder retinalen IRI (114) kann es aber die Situation verschlimmern (35, 211). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die gesteigerte iNOS-Expression mit der Gliazellaktivierung zusammenhängt, welche zum Zelltod der Neurone führen kann (114). Die Zytotoxizität des produzierten NO kommt vermutlich über die Bildung von $ONOO^-$ (35, 114, 381) sowie die Hemmung der DNA-Synthese (35, 211) und von Eisen-Schwefel-Clusterhaltigen Enzymen (35) zustande. Auch scheint die neurovaskuläre Kopplung durch die iNOS ungünstig beeinflusst zu werden (382).

Der eNOS hingegen werden generell neuroprotektive Effekte im Rahmen (zerebraler) IRI zugeschrieben (199, 343, 377, 378). Ihre Hauptlokalisierung ist das Endothel (78, 202), wo sich das von der eNOS produzierte NO mittels der Vasodilatation (199, 212, 234, 344, 383), Hemmung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion (199, 200, 212, 344, 383) und als Radikalfänger günstig auf die (postischämische) Perfusion auswirkt (269, 344, 383).

Neben dieser Lokalisation kommt die eNOS postischämisch auch in Neuronen vor: In-vitro-Studien weisen darauf hin, dass sie hier das neuronale Überleben beim zerebralen IRI über eine vermehrte Sekretion des brain derived neurotrophic factor

(BDNF) begünstigen kann (384). Zudem scheint die Neuroinflammation durch die eNOS gehemmt zu werden, da in ihrer Abwesenheit verschiedene Entzündungsmarker erhöht vorliegen (383) und der mutmaßlich hemmende Einfluss der eNOS auf die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B fehlen dürfte (273).

Auch die Grundausstattung der eNOS könnte zu ihrer protektiven Wirkung beitragen: sie arbeitet mit einer deutlich geringeren Maximalgeschwindigkeit, als ihre Isoformen (105), und hat eine geringere Neigung zur Entkopplung (203). Damit dürfte die Gefahr einer toxischen NO- oder der ROS-Produktion durch die eNOS geringer sein. Durch diese Charakteristiken kann die eNOS neben den oben beschriebenen antiinflammatorischen Wirkungen und günstigen Effekten auf die Perfusion von ihren Isoformen weiter abgegrenzt werden.

Somit ist eine Hemmung der Genexpression der nNOS und der iNOS ein wünschenswertes Ziel bei retinalen IRI, wohingegen erhöhte mRNA-Level der eNOS zur Reduktion des Schadens beitragen könnten.

4.4.2 NOS - Expression: Erwartete Veränderungen beim (retinalen) IRI

Die bisher beschriebenen Veränderungen der nNOS-Genexpression nach retinalem IRI entwerfen ein verschwommenes Bild: bei Studien an den Retinae von Ratten sind sowohl vermehrte Proteinmengen (immunhistochemisch) während der ersten postischämischen Woche (und darüber hinaus) (216, 375, 385), als auch ein anhaltender Abfall der mRNA-Level in den ersten beiden Tagen (377) oder des Proteins (immunhistochemisch) (386) beschrieben. Studien an Mäusen zu dieser Fragestellung finden sich lediglich für zerebrale IRI, bei denen ein Anstieg der mRNA-Level nach 24 Stunden (343), des Proteins (immunhistochemisch) nach 72 Stunden (313) und der Aktivität der nNOS (380) sowie auch eine vermehrte, mit der nNOS assoziierte Nitrotyrosinbildung (380) beobachtet wurden. Auch bei anderen Formen von Gewebsschädigungen im Gehirn wurde eine verstärkte Genexpression und Aktivität der nNOS verzeichnet (197, 199).

Auf der Basis dieser Ergebnisse darf ein Anstieg der nNOS-Proteinkonzentrationen erwartet werden, wenngleich unklar ist, ob dies auch auf die mRNA-Level zutrifft.

Bekannte fördernde Einflussfaktoren auf die Genexpression der nNOS sind Östrogen (197) und eine Lichtstimulation (218, 387). Diese beiden Größen sollten hier jedoch keinen (konfundierenden) Einfluss haben, da sie zwischen den Gruppen nicht

variieren. Der Promotor der nNOS weist allerdings auch Bindungsstellen für NF- κ B auf (199), sodass die theoretische Grundlage für die formulierte Erwartung vorliegt.

Die Antwort auf die Frage nach der veränderten iNOS-Expression scheint klarer: sie wird durch entzündungsassoziierte Zytokine (TNF α , IL-1) (14, 38, 227) sowie die Aktivierung von NF- κ B (105, 197, 199) induziert und in der Retina von Ratten kommt es 6-24 Stunden nach der Ischämie zu einem signifikanten Anstieg ihrer mRNA-Level (83, 226, 327, 381, 388) und Proteinkonzentrationen (83, 114, 327, 388). Passend hierzu konnten erhöhte NO-Konzentrationen festgestellt werden (2). Immunhistochemisch haben Yan und Kollegen bei Ratten in der Retina auch 7 Tage nach einer Ischämie noch eine signifikante Erhöhung der iNOS beobachtet (2), wenngleich einer ähnlichen Untersuchung ein solcher Nachweis nur bis zum fünften postischämischen Tag in der Retina gelang (114). Gleichfalls sind über eine Flowzytometrie nach einer Woche Reperfusion erhöhte iNOS-Proteinkonzentrationen in retinalen Mikroglia von Mäusen (C57BL/6) festgestellt (389). Es darf also ein Anstieg der Genexpression der iNOS beim retinalen IRI erwartet werden, der allgemein auch bei anderen Schädigungen der Retina aufzutreten scheint: Beispiele hierfür sind pathologische Lichtintensitäten (202), neuronale Verletzungen (212), chirurgische Manipulation (216) oder Erkrankungen, die mit einem IRI einhergehen, wie die diabetische Retinopathie und das Glaukom (212, 382, 389). Ursächlich für die Induktion der iNOS beim retinalen IRI kann neben dem nachgewiesenen Vorkommen der induzierenden Zytokine (4, 226) auch die Aktivierung von NF- κ B sein (327), da passende Bindungsstellen in ihrem Promotor auftreten (197).

Für die eNOS kann im Rahmen des retinalen IRI bei Ratten oder Mäusen ein Anstieg ihrer mRNA (377), des Proteins (immunhistochemisch) (277) und vermutlich ihrer Aktivität (bzw. ein aktivitätsgesteigerter Zustand) (273) festgestellt werden. Diese Untersuchungen decken sich mit Ergebnissen von zerebralen IRI an ähnlichen Spezies, bei denen ebenfalls eine Zunahme der mRNA-Level (343), des Proteins (384, 390, 391) und der eNOS-Aktivität (380, 390) beschrieben sind. Jedoch gibt es auch Untersuchungen, die unveränderte (392) oder verminderte (344) zerebrale Proteinkonzentrationen der eNOS verzeichnen und damit einen Widerspruch bilden. Der überwiegende Anteil der Studien spricht dennoch für einen Anstieg der eNOS (mRNA, Protein, Aktivität) beim retinalen (oder zerebralen) IRI.

Zu den positiven Stimuli für die Genexpression der eNOS zählen die Schubspannung (197, 203), Östrogen (38) und der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (32, 38, 212), die hier jedoch gleichfalls keinen konfundierenden Einfluss haben sollten. VEGF

wird über HIF-1 α bei Hypoxie induziert (32) und könnte eine Grundlage für die gesteigerte eNOS-Expression liefern.

Demnach scheint für alle drei NOS-Isoformen zu gelten, dass beim retinalen IRI mit einem Anstieg der Genexpression gerechnet werden darf, wenngleich die Evidenzbasis unterschiedlich gut ist. Zumeist werden die Veränderungen der NOS während der ersten 24 – 96 Stunden der Reperfusion ermittelt [nNOS (313, 343); iNOS (83, 226, 327, 381, 388); eNOS (273, 343, 377, 390, 391)]. Darüber hinaus scheint sich im Falle der iNOS bzw. eNOS ein Rückgang der mRNA-Level nach 48 Stunden (226) bzw. 24 Stunden (377) beim retinalen IRI abzuzeichnen. Es ist jedoch aufgrund der langfristig erhöhten Proteinkonzentrationen aller drei Isoformen unklar, ob die gesunkenen mRNA-Level persistieren (und nur das Proteinniveau langfristig erhöht bleibt) oder ob ein erneuter Anstieg der Transkription erhöhte Proteinkonzentrationen verursacht. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch keinen Anstieg der mRNA-Level in der späten Reperfusion und sprechen daher gegen letztere Annahme. Die Untersuchungen, welche die längerfristigen Veränderungen der NOS beim retinalen IRI betrachten, basieren hingegen auf dem Nachweis des jeweiligen NOS-Proteins [nNOS (375, 385); iNOS (2, 114, 389); eNOS (277)]. Zudem stammen die meisten Ergebnisse hierzu aus Untersuchungen retinaler IRI an *Ratten*. Damit ist denkbar, dass der Zeitpunkt und der Parameter (Protein statt mRNA) der Untersuchung oder die untersuchte Spezies die Diskrepanzen verursachen. Es scheint, als sei der vermutete Anstieg der Genexpression für die NOS-Familie beim retinalen IRI während der späten Reperfusion nur auf der Ebene des Proteins und möglicherweise der Aktivität nachweisbar.

Im Falle der iNOS könnte auch der Anteil und Aktivierungsgrad von Mikroglia in der Retina einen Einfluss haben, da bei der Durchflusszytometrie die iNOS vorwiegend in retinalen Mikroglia nachgewiesen wurde (389). Auch scheint die Analyse der iNOS-Expression in der gesamten Retina zu einem früheren Verlust der Signifikanz zu führen, als die Betrachtung eines Ausschnitts wie dem Sehnervenkopf (114). Somit können verschiedene Einflussfaktoren zur Erklärung der Unterschiede zwischen erwarteten und eingetretenen Veränderungen herangezogen werden.

4.4.3 Der Einfluss der Betulinsäure auf die NOS - Expression beim (retinalen) IRI

Die nNOS ist bei einem IRI vorwiegend für die toxischen NO-Konzentrationen und Wirkungen in der frühen Reperfusionsphase zuständig, wohingegen die iNOS in der späteren Phase führend ist (380). Eine Hemmung des postischämischen Anstiegs von

nNOS und iNOS sowie die Induktion der protektiven eNOS erscheinen damit als wünschenswerte pharmakologische Ziele.

Lu und Kollegen (269) verzeichnen an Mäusen mit zerebralem IRI unter Betulinsäure (50mg/kg KGW p.o.) eine Hemmung des postischämischen Anstiegs der mRNA-Niveaus der nNOS und iNOS, und – auch in der nicht-ischämischen Hemisphäre – eine gesteigerte Transkription der eNOS. Daher scheint die Betulinsäure geeignet zu sein, um die gewünschten Ziele zu erreichen.

Unterstützt wird diese Annahme, da sich diese Effekte der Betulinsäure auf die nNOS und iNOS auch in einem In-vitro-Modell für zerebrale IRI (253) zeigt. Außerdem wird auch die bei Entzündungen auftretende Induktion der iNOS in vitro (246, 266) und bei verschiedenen Organen auch in vivo durch die Gabe von Betulinsäure vermindert (248, 270). Darüber hinaus zeigt sich in vitro an humanen Endothelzellen eine vermehrte Aktivität des Promotors, der Transkription (mRNA) und der Translation (Protein) der eNOS unter Betulinsäure (208). Somit sind die Ergebnisse der Experimente in vivo und in vitro insgesamt kongruent.

Diese Ergebnisse ließen sich hier nicht reproduzieren. Möglicherweise ist die in vitro beobachtete Wirkung in vivo geringer ausgeprägt oder gehört nicht zu den langfristigen Effekten nach retinalem IRI. Auch ist denkbar, dass die Betulinsäure im Gehirn prononciertere Veränderungen verursacht, als in der Retina und hierdurch die Diskrepanzen auftreten. Weiterhin ist die Gabe der Betulinsäure bei besagtem zerebralem IRI in vivo überwiegend *vor* dem IR-Ereignis an Apoprotein-E-Knockout-Mäusen erfolgt. Sowohl der Zeitpunkt der Betulinsäuregabe, als auch der Genotyp können somit als maßgebliche Einflussfaktoren nicht ausgeschlossen werden.

5. Einschränkungen und Grenzen dieser experimentellen Untersuchung

Jede experimentelle Arbeit ist aufgrund der artifiziellen Erzeugung von Pathologien und der Grenzen der verwendeten Analysemethoden Einschränkungen unterworfen. Der Nachweis von erhöhten ROS-Konzentrationen in den ischämischen Retinae über die DHE-Färbung ist hier nicht gelungen. Es gibt neben dieser und anderen indirekten Methoden auch die Möglichkeit der direkten (125) Messung gebildeter ROS. Hierfür werden die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie oder das Spin Trapping eingesetzt: es handelt sich zwar um hochspezifische Methoden (59, 299), jedoch scheinen sie sich noch in der Entwicklung zu befinden (146) beziehungsweise zum Screening ungeeignet (299) zu sein. Wenngleich Granger und Kollegen (24) diese Methoden als Goldstandard betrachten, empfehlen neuere Publikationen die

Kombination von DHE mit anderen Analyseverfahren (299). Darüber hinaus hat DHE zwar eine relative Spezifität für $O_2^{\cdot-}$ (24), reagiert aber auch mit anderen ROS zu den fluoreszierenden Produkten Hydroxyethidium (2-OH-Ethidium) und Ethidium (299, 300). Demnach ist die gewählte Methode prinzipiell geeignet, auch da eine Differenzierung der ROS nicht für den Nachweis oxidativen Stresses vonnöten ist. Ein Problem bleibt jedoch bestehen, da aufgrund der relativen Spezifität von DHE für $O_2^{\cdot-}$ unklar ist, wie gut H_2O_2 und damit indirekt die Auswirkungen der NOX4-Induktion unter Betulinsäure nach IRI erfasst werden kann.

Die veränderten Transkriptionsraten verschiedener pro- und antioxidativer Enzyme geben einen Hinweis darauf, über welche Mechanismen die Betulinsäure ihre protektive Wirkung entfaltet. Jedoch sind mRNA-Level lediglich eine erste Annäherung an die tatsächlichen Enzymkonzentrationen und -aktivitäten in der Retina. Sie können daher nur ein ungefähres Bild vermitteln und der Einfluss der Betulinsäure auf die kurzfristigen Reaktionen direkt nach Beginn der Reperfusion werden nicht erfasst. Kurzfristige Veränderungen könnten sich vermutlich noch in den Proteinkonzentrationen oder Aktivitäten auch nach Normalisierung der mRNA-Level niederschlagen. Bei der Entscheidung für diese Parameter hätte man sich allerdings auf eine Auswahl der untersuchten Enzyme beschränken oder die Stichprobe deutlich erhöhen müssen, sodass entweder ein eingeschränktes Bild entstünde oder der zeitliche und monetäre Aufwand stiege. Daher stellt die hier verwendete PCR zur orientierenden Exploration der Wirkung der Betulinsäure beim retinalen IRI eine geeignete Methode dar, wenngleich bei der Betrachtung im Hinterkopf behalten werden muss, dass erhöhte mRNA-Level nicht zwingend mit gesteigerten Enzymaktivitäten und den konsekutiven Wirkungen einhergehen müssen. Die im Einzelnen beschriebenen Auswirkungen der Betulinsäure durch die Enzyme sind demnach (noch) theoretischer Natur, deren reale Relevanz überprüft werden muss. Diese Arbeit trägt aber zur Grundlage des Verständnisses des retinalen IRI und der Betulinsäure hierin bei, auf deren Basis das Bild in Folgeexperimenten verfeinert werden kann.

VI. Zusammenfassung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) der Retina geht mit einem Verlust retinaler Neurone einher und tritt bei verschiedenen ophthalmologischen Erkrankungen auf. Hierunter sind Erkrankungen vertreten, die zu den wichtigsten Erblindungsursachen in Deutschland zählen und neuer Therapieoptionen bedürfen. Diese Dissertation untersucht den Einfluss des pflanzlichen Triterpenoids Betulinsäure auf den retinalen IRI im Mausmodell (C57BL/6J). Der Fokus liegt hierbei insbesondere auf dem oxidativen Stress, der einen (besonders) wichtigen Aspekt des retinalen IRI darstellt.

Der retinale IRI wird durch eine Erhöhung des Intraokulardrucks induziert. Hierzu werden beidseitig Kanülen in die Vorderkammern der Augen eingeführt. Über angeschlossene Infusionen (0,9% NaCl) wird der Intraokulardruck einseitig für 45 Minuten auf 110 mmHg gesteigert, während er im Partnerauge, das als Kontrolle dient, bei 15 mmHg gehalten wird. Die Betulinsäure (50mg/kg KGW) wird per os täglich vom Vortag des IRI bis zum siebten Tag der Reperfusion in der Behandlungsgruppe verabreicht. Im selben Zeitraum werden der Kontrollgruppe die Trägersubstanzen ohne Betulinsäure per os zugeführt. Am achten Tag der Reperfusion erfolgt die Auswertung des Einflusses der Betulinsäure auf den retinalen IRI.

Der Verlust von Neuronen in der Ganglienzellschicht nach IRI wird über eine Kresylblau-Färbung retinaler Flachpräparate erfasst und ist unter Betulinsäure verringert. Die Ergebnisse der Toluidinblau-Färbung von Sehnervenquerschnitten erfassen unter Betulinsäure ebenfalls eine Reduktion des Verlusts retinaler Ganglienzellen nach IRI. Demnach treten unter Betulinsäure protektive Effekte auf und der Verlauf des retinalen IRI wird günstig beeinflusst.

In den Retinae kann mithilfe Dihydroethidin-Färbung kein unterschiedlicher Gehalt reaktiver Sauerstoffverbindungen nach dem IRI festgestellt werden. Somit verweist nur die Induktion der prooxidativen NOX2 in beiden Untersuchungsgruppen indirekt auf das Auftreten von oxidativem Stress am achten Tag der Reperfusion.

Abgesehen von der NOX2 werden aufgrund von vorausgegangenen Untersuchungen auch für verschiedene andere pro- und antioxidative Enzyme veränderte Genexpressionen nach IRI erwartet. Diese Erwartungen basieren unter anderem auf Beschreibungen einer Stimulation ihrer Expression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, sowie eine inhibitorische Wirkung der Betulinsäure auf diesen Prozess. Die hiesigen Ergebnisse aus der quantitativen RT-PCR zum mRNA-Gehalt der

verschiedenen Gruppen und Augen können diese Evidenz allerdings nicht weiter untermauern. Vermutlich spielen demnach beim retinalen IRI andere Mechanismen für längerfristige Veränderungen der Genexpressionen eine tragende Rolle.

Die protektive Wirkung der Betulinsäure beim IRI hat sich bereits an anderen Organen als der Retina nachweisen lassen. Jedoch beziehen sich diese Untersuchungen auf die ersten 24 Stunden der Reperfusion. Die hier vorliegende Dissertation weist erstmals nach, dass der neuroprotektive Einfluss der Betulinsäure beim retinalen IRI auch nach acht Tagen Reperfusion persistiert.

Zudem wurde gezeigt, dass zu diesem späteren Zeitpunkt eine Induktion der Enzyme SOD1, SOD3, HO1 und NOX4 unter Betulinsäure vorliegt. Die antioxidativen Enzyme SOD1, SOD3 und HO1 vermitteln diverse günstige Effekte beim (retinalen) IRI und dürften – wenigstens teilweise – für die protektive Wirkung der Betulinsäure verantwortlich sein. Im Fall der NOX4 ist hingegen noch unklar, ob ihre Induktion als Nebenwirkung, als Teil einer wirkungsvermittelnden Signalkaskade (möglicherweise über den Transkriptionsfaktor Nrf2) oder als eigenständige protektive Wirkung der Betulinsäure anzusehen ist. In der Literatur findet sich erste Evidenz für alle drei Ansätze.

Es lässt sich festhalten, dass die Betulinsäure aufgrund ihrer geringen Toxizität und der festgestellten protektiven Effekte einen potentiellen Therapieansatz für den retinalen IRI darstellt. Diese Dissertation hat ergeben, dass die Enzyme SOD1, SOD3, HO1 und möglicherweise NOX4 langfristig in die Neuroprotektion der Retina beim IRI unter Betulinsäure involviert sind.

Zukünftige Untersuchungen zum optimalen Zeitfenster der Therapie mit Betulinsäure (prä- versus postexpositorisch) und deren Wirkmechanismen werden dazu beitragen, das Potential der Betulinsäure als Therapeutikum beim retinalen IRI besser zu beleuchten. Hilfreich dürfte hierbei auch sicherlich ein besseres Verständnis der NOX4 und ihrer Rolle beim IRI sein.

Letztendlich unterstützen die Resultate der vorliegenden Dissertation die zugrunde liegende Hypothese, dass Betulinsäure auch zur Therapie des retinalen IRI beim Menschen geeignet sein könnte.

VII. Literaturverzeichnis

1. Laspas P, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Kordasz ML, Manicam C, Wojnowski L, et al. Role of nitric oxide synthase isoforms for ophthalmic artery reactivity in mice. *Experimental eye research*. 2014;127:1-8.
2. Yan H, Peng Y, Huang W, Gong L, Li L. The Protective Effects of alphaB-Crystallin on Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Retina. *Journal of ophthalmology*. 2017;2017:7205408.
3. Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Iandiev I, Reichenbach A, Wiedemann P. Neuronal versus glial cell swelling in the ischaemic retina. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 2005;83(5):528-38.
4. Dvorianchikova G, Degterev A, Ivanov D. Retinal ganglion cell (RGC) programmed necrosis contributes to ischemia-reperfusion-induced retinal damage. *Experimental eye research*. 2014;123:1-7.
5. Minhas G, Sharma J, Khan N. Cellular Stress Response and Immune Signaling in Retinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in immunology*. 2016;7:444.
6. Li SY, Fu ZJ, Lo AC. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012:426769.
7. Deliyanti D, Wilkinson-Berka JL. Inhibition of NOX1/4 with GKT137831: a potential novel treatment to attenuate neuroglial cell inflammation in the retina. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:136.
8. Kanski JJ, Bowling B, Nischal K, Pearson A. 10 - Glaukom. *Klinische Ophthalmologie*. 7 ed. München: Elsevier GmbH; 2012. p. 317-410.
9. Krizaj D, Ryskamp DA, Tian N, Tezel G, Mitchell CH, Slepak VZ, et al. From mechanosensitivity to inflammatory responses: new players in the pathology of glaucoma. *Current eye research*. 2014;39(2):105-19.
10. Pfau N, Kern AO, Wolfram C, Kalcklösch M, Prütz F. Blindheit und Sehbehinderung - GBE-Themenheft. In: Robert-Koch-Institut, editor.; published on edoc: 2017-03-16T13:36:00Z
access: 2018-05-13T15:09:09Z: Robert Koch-Institut; 2017.
11. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, Retinologische Gesellschaft, e.V. BdA. S2e-Leitlinie:Retinale arterielle Verschlüsse (RAV): AWMF online; 2016 Nov 23 [cited 2018 Mar 19]. Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/045-013l_S2e_Retinale_Arterienverschluesse_2017-08.pdf.

12. Dvorianchikova G, Barakat DJ, Hernandez E, Shestopalov VI, Ivanov D. Toll-like receptor 4 contributes to retinal ischemia/reperfusion injury. *Mol Vis*. 2010;16:1907-12.
13. Chen H, Song Z, Ying S, Yang X, Wu W, Tan Q, et al. Myeloid differentiation protein 2 induced retinal ischemia reperfusion injury via upregulation of ROS through a TLR4-NOX4 pathway. *Toxicology letters*. 2018;282:109-20.
14. Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in retinal and eye research*. 2004;23(1):91-147.
15. Cheung CY, Ikram MK, Chen C, Wong TY. Imaging retina to study dementia and stroke. *Progress in retinal and eye research*. 2017;57:89-107.
16. Jindal V. Interconnection between brain and retinal neurodegenerations. *Molecular neurobiology*. 2015;51(3):885-92.
17. London A, Benhar I, Schwartz M. The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nature reviews Neurology*. 2013;9(1):44-53.
18. Hayreh SS, Weingeist TA. Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia. *The British journal of ophthalmology*. 1980;64(11):818-25.
19. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain research*. 1990;528(1):21-4.
20. Andreeva K, Soliman MM, Cooper NG. Regulatory networks in retinal ischemia-reperfusion injury. *BMC genetics*. 2015;16:43.
21. Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)*. 2009;10(7):644-54.
22. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*. 2010;47(2):122-9.
23. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin*. 2004;70:71-86.
24. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox biology*. 2015;6:524-51.
25. Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and

- Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016:3164734.
26. Muller A, Maurin L, Bonne C. Free radicals and glutamate uptake in the retina. *General pharmacology*. 1998;30(3):315-8.
 27. Baltmr A, Duggan J, Nizari S, Salt TE, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma - Is there a future role? *Experimental eye research*. 2010;91(5):554-66.
 28. Opere CA, Heruye S, Njie-Mbye YF, Ohia SE, Sharif NA. Regulation of Excitatory Amino Acid Transmission in the Retina: Studies on Neuroprotection. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2017.
 29. Russo R, Cavaliere F, Varano GP, Milanese M, Adornetto A, Nucci C, et al. Impairment of neuronal glutamate uptake and modulation of the glutamate transporter GLT-1 induced by retinal ischemia. *PloS one*. 2013;8(8):e69250.
 30. Bonne C, Muller A, Villain M. Free radicals in retinal ischemia. *General pharmacology*. 1998;30(3):275-80.
 31. Brennan-Minnella AM, Won SJ, Swanson RA. NADPH oxidase-2: linking glucose, acidosis, and excitotoxicity in stroke. *Antioxidants & redox signaling*. 2015;22(2):161-74.
 32. Pournaras CJ, Rungger-Brandle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Progress in retinal and eye research*. 2008;27(3):284-330.
 33. Yuki K, Yoshida T, Miyake S, Tsubota K, Ozawa Y. Neuroprotective role of superoxide dismutase 1 in retinal ganglion cells and inner nuclear layer cells against N-methyl-d-aspartate-induced cytotoxicity. *Experimental eye research*. 2013;115:230-8.
 34. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P. Ischaemia- and reperfusion-induced Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ shifts in rat retina: effects of two free radical scavengers, SOD and EGB 761. *Experimental eye research*. 1992;55(1):39-45.
 35. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S. Nitric oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision research*. 1996;36(18):2979-94.
 36. Kim IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, et al. Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Experimental brain research*. 1998;121(4):419-24.
 37. Tekmen-Clark M, Gleason E. Nitric oxide production and the expression of two nitric oxide synthases in the avian retina. *Visual neuroscience*. 2013;30(3):91-103.

38. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
39. Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*. 2012;51(14):2959-73.
40. Augustin AJ. [Oxidative tissue damage]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2010;227(2):90-8.
41. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43-50.
42. Perrone S, Bracciali C, Di Virgilio N, Buonocore G. Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. *Frontiers in pediatrics*. 2016;4:143.
43. Minhas G, Modgil S, Anand A. Role of iron in ischemia-induced neurodegeneration: mechanisms and insights. *Metabolic brain disease*. 2014;29(3):583-91.
44. Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*. 2008;10(9):1527-48.
45. Ophir A, Berenshtein E, Kitrossky N, Berman ER, Photiou S, Rothman Z, et al. Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Experimental eye research*. 1993;57(3):351-7.
46. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2007;87(1):245-313.
47. Brandes RP, Schroder K. Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends in cardiovascular medicine*. 2008;18(1):15-9.
48. Forstermann U, Li H. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British journal of pharmacology*. 2011;164(2):213-23.
49. Chuong Nguyen MV, Lardy B, Paclet MH, Rousset F, Berthier S, Baillet A, et al. [NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family]. *Medecine sciences : M/S*. 2015;31(1):43-52.
50. Kahles T, Brandes RP. Which NADPH oxidase isoform is relevant for ischemic stroke? The case for nox 2. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(12):1400-17.
51. Yokota H, Narayanan SP, Zhang W, Liu H, Rojas M, Xu Z, et al. Neuroprotection from retinal ischemia/reperfusion injury by NOX2 NADPH oxidase deletion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8123-31.

52. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
53. Jung JE, Kim GS, Chen H, Maier CM, Narasimhan P, Song YS, et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Molecular neurobiology*. 2010;41(2-3):172-9.
54. Sandbach JM, Coscun PE, Grossniklaus HE, Kokoszka JE, Newman NJ, Wallace DC. Ocular pathology in mitochondrial superoxide dismutase (Sod2)-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(10):2173-8.
55. Percy ME. Catalase: an old enzyme with a new role? *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire*. 1984;62(10):1006-14.
56. Richard MJ, Belleville F, Chalas J, Ceballos-Picot I, Vitoux D, Boyer MJ, et al. [Glutathione peroxidases: value of their determination in clinical biology]. *Annales de biologie clinique*. 1997;55(3):195-207.
57. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta*. 2006;1763(12):1755-66.
58. Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):8010-4.
59. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2003;285(2):R277-97.
60. Gelfand BD, Wright CB, Kim Y, Yasuma T, Yasuma R, Li S, et al. Iron Toxicity in the Retina Requires Alu RNA and the NLRP3 Inflammasome. *Cell reports*. 2015;11(11):1686-93.
61. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2010;50:323-54.
62. Cheng Y, Rong J. Therapeutic Potential of Heme Oxygenase-1/carbon Monoxide System Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(26):3884-98.
63. Castilho A, Avelaira CA, Leal EC, Simoes NF, Fernandes CR, Meirinhos RI, et al. Heme oxygenase-1 protects retinal endothelial cells against high glucose- and oxidative/nitrosative stress-induced toxicity. *PloS one*. 2012;7(8):e42428.

64. He M, Pan H, Chang RC, So KF, Brecha NC, Pu M. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. *PloS one*. 2014;9(1):e84800.
65. Katori M, Anselmo DM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system. *Transplant immunology*. 2002;9(2-4):227-33.
66. Yano Y, Ozono R, Oishi Y, Kambe M, Yoshizumi M, Ishida T, et al. Genetic ablation of the transcription repressor Bach1 leads to myocardial protection against ischemia/reperfusion in mice. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2006;11(7):791-803.
67. Bai YY, Yan D, Zhou HY, Li WX, Lou YY, Zhou XR, et al. Betulinic acid attenuates lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in the rat aorta by modulating Nrf2 antioxidative function. *Inflammopharmacology*. 2020;28(1):165-74.
68. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in cell biology*. 2016;26(3):165-76.
69. Lin WJ, Kuang HY. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy*. 2014;10(10):1692-701.
70. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research*. 2001;34(4):325-36.
71. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*. 1995;64:97-112.
72. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(6):1583-606.
73. Holley AK, Bakthavatchalu V, Velez-Roman JM, St Clair DK. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *International journal of molecular sciences*. 2011;12(10):7114-62.
74. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*. 2011;15(7):1957-97.
75. Fu Y, Sies H, Lei XG. Opposite roles of selenium-dependent glutathione peroxidase-1 in superoxide generator diquat- and peroxynitrite-induced apoptosis and signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(46):43004-9.

76. Koppenol WH. 100 years of peroxy-nitrite chemistry and 11 years of peroxy-nitrite biochemistry. *Redox report*. 2001;6(6):339-41.
77. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.
78. Jin RC, Loscalzo J. Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *Journal of blood medicine*. 2010;2010(1):147-62.
79. Jiang W, Tang L, Zeng J, Chen B. Adeno-associated virus mediated SOD gene therapy protects the retinal ganglion cells from chronic intraocular pressure elevation induced injury via attenuating oxidative stress and improving mitochondrial dysfunction in a rat model. *American journal of translational research*. 2016;8(2):799-810.
80. Kim GW, Lewen A, Copin J, Watson BD, Chan PH. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience*. 2001;105(4):1007-18.
81. Wang B, Cao W, Biswal S, Dore S. Carbon monoxide-activated Nrf2 pathway leads to protection against permanent focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2011;42(9):2605-10.
82. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annual review of nutrition*. 2007;27:41-61.
83. Sun MH, Pang JH, Chen SL, Han WH, Ho TC, Chen KJ, et al. Retinal protection from acute glaucoma-induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(9):4798-808.
84. Behndig A, Svensson B, Marklund SL, Karlsson K. Superoxide dismutase isoenzymes in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(3):471-5.
85. Liu XH, Kato H, Araki T, Itoyama Y, Kato K, Kogure K. An immunohistochemical study of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain research*. 1994;644(2):257-66.
86. Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neuroscience letters*. 1999;267(1):13-6.

87. Arai-Gaun S, Katai N, Kikuchi T, Kurokawa T, Ohta K, Yoshimura N. Heme oxygenase-1 induced in muller cells plays a protective role in retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(11):4226-32.
88. Wegiel B, Nemeth Z, Correa-Costa M, Bulmer AC, Otterbein LE. Heme oxygenase-1: a metabolic nuke. *Antioxidants & redox signaling.* 2014;20(11):1709-22.
89. Gadola SD. Kapitel 1 - Einführung in das Immunsystem. *Klinische Immunologie (3 Auflage).* Munich: Urban & Fischer; 2012. p. 3-76.
90. Ishibashi N, Prokopenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl KR, Mirochnitchenko O. Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Brain research Molecular brain research.* 2002;109(1-2):34-44.
91. Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Perry B, Chan PH, Inouye M, Mirochnitchenko O. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain research Molecular brain research.* 1998;53(1-2):333-8.
92. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 2002;33(3):337-49.
93. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biological chemistry.* 2006;387(10-11):1329-35.
94. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta.* 2013;1830(5):3289-303.
95. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological reviews.* 2006;86(2):583-650.
96. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology.* 1995;252:38-53.
97. Li JJ, Zou ZY, Liu J, Xiong LL, Jiang HY, Wang TH, et al. Biliverdin administration ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in rats and is associated with proinflammatory factor downregulation. *Experimental and therapeutic medicine.* 2017;14(1):671-9.
98. Yoon JJ, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS. Protective role of betulinic acid on TNF-alpha-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2010;391(1):96-101.

99. Barakat DJ, Dvorientchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF-kappaB mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *J Neurochem.* 2012;120(4):586-97.
100. Crack PJ, Taylor JM, Ali U, Mansell A, Hertzog PJ. Potential contribution of NF-kappaB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury. *Stroke.* 2006;37(6):1533-8.
101. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005;37(12):2466-71.
102. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *The New England journal of medicine.* 2011;364(7):656-65.
103. Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free radical biology & medicine.* 2003;35(3):236-56.
104. Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free radical biology & medicine.* 2009;47(4):344-56.
105. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78(6):915-8.
106. Hangai M, Yoshimura N, Honda Y. Increased cytokine gene expression in rat retina following transient ischemia. *Ophthalmic research.* 1996;28(4):248-54.
107. Aztatzi-Santillan E, Nares-Lopez FE, Marquez-Valadez B, Aguilera P, Chanez-Cardenas ME. The protective role of heme oxygenase-1 in cerebral ischemia. *Central nervous system agents in medicinal chemistry.* 2010;10(4):310-6.
108. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free radical biology & medicine.* 2017;112:464-79.
109. Kodydkova J, Vavrova L, Kocik M, Zak A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia biologica.* 2014;60(4):153-67.
110. Sigfrid LA, Cunningham JM, Beeharry N, Lortz S, Tiedge M, Lenzen S, et al. Cytokines and nitric oxide inhibit the enzyme activity of catalase but not its protein or mRNA expression in insulin-producing cells. *Journal of molecular endocrinology.* 2003;31(3):509-18.
111. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2000;57(13-14):1825-35.
112. Flohe L, Andreesen JR, Brigelius-Flohe R, Maiorino M, Ursini F. Selenium, the element of the moon, in life on earth. *IUBMB life.* 2000;49(5):411-20.

113. Yamauchi K, Nakano Y, Imai T, Takagi T, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. A novel nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator RS9 attenuates brain injury after ischemia reperfusion in mice. *Neuroscience*. 2016;333:302-10.
114. Cho KJ, Kim JH, Park HY, Park CK. Glial cell response and iNOS expression in the optic nerve head and retina of the rat following acute high IOP ischemia-reperfusion. *Brain research*. 2011;1403:67-77.
115. Lee D, Shim MS, Kim KY, Noh YH, Kim H, Kim SY, et al. Coenzyme Q10 inhibits glutamate excitotoxicity and oxidative stress-mediated mitochondrial alteration in a mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(2):993-1005.
116. Wilkinson-Berka JL, Deliyanti D, Rana I, Miller AG, Agrotis A, Armani R, et al. NADPH oxidase, NOX1, mediates vascular injury in ischemic retinopathy. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(17):2726-40.
117. Chan EC, van Wijngaarden P, Liu GS, Jiang F, Peshavariya H, Dusting GJ. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(10):7061-7.
118. Brandes RP, Takac I, Schröder K. No superoxide—no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! : *Am Heart Assoc*; 2011.
119. Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation research*. 2012;110(9):1217-25.
120. Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: a multifarious NADPH oxidase. *Am Heart Assoc*; 2012.
121. Choi DH, Kim JH, Lee KH, Kim HY, Kim YS, Choi WS, et al. Role of neuronal NADPH oxidase 1 in the peri-infarct regions after stroke. *PloS one*. 2015;10(1):e0116814.
122. Dvorianchikova G, Grant J, Santos AR, Hernandez E, Ivanov D. Neuronal NAD(P)H oxidases contribute to ROS production and mediate RGC death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(6):2823-30.
123. Song H, Vijayasathay C, Zeng Y, Marangoni D, Bush RA, Wu Z, et al. NADPH Oxidase Contributes to Photoreceptor Degeneration in Constitutively Active RAC1 Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(6):2864-75.
124. Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, Ben Mkaddem S, Coant N, Daniel F, et al. [The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases]. *Medecine sciences : M/S*. 2006;22(11):953-9.

125. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Current Medicinal Chemistry*. 2001;8, No.7:829-38(10).
126. Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B, et al. A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. *Science (New York, NY)*. 2000;287(5450):138-42.
127. Radermacher KA, Wingler K, Kleikers P, Altenhofer S, Jr Hermans J, Kleinschnitz C, et al. The 1027th target candidate in stroke: Will NADPH oxidase hold up? *Experimental & translational stroke medicine*. 2012;4(1):11.
128. Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Goraca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2012;60(4):277-94.
129. Lee SB, Bae IH, Bae YS, Um HD. Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(47):36228-35.
130. Elton TS, Selemo H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 2013;532(1):1-12.
131. Wang H, Yang Z, Jiang Y, Hartnett ME. Endothelial NADPH oxidase 4 mediates vascular endothelial growth factor receptor 2-induced intravitreal neovascularization in a rat model of retinopathy of prematurity. *Mol Vis*. 2014;20:231-41.
132. Li J, Wang JJ, Zhang SX. NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy. *Journal of diabetes research*. 2015;2015:963289.
133. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(2):263-74.
134. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1804(2):245-62.
135. Mondola P, Damiano S, Sasso A, Santillo M. The Cu, Zn Superoxide Dismutase: Not Only a Dismutase Enzyme. *Frontiers in physiology*. 2016;7:594.
136. Agardh CD, Gustavsson C, Hagert P, Nilsson M, Agardh E. Expression of antioxidant enzymes in rat retinal ischemia followed by reperfusion. *Metabolism: clinical and experimental*. 2006;55(7):892-8.
137. Valentine JS, Doucette PA, Zittin Potter S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annual review of biochemistry*. 2005;74:563-93.

138. Creagan R, Tischfield J, Ricciuti F, Ruddle FH. Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: Mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. *Humangenetik*. 1973;20(3):203-9.
139. Hashizume K, Hirasawa M, Imamura Y, Noda S, Shimizu T, Shinoda K, et al. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *The American journal of pathology*. 2008;172(5):1325-31.
140. Yuki K, Ozawa Y, Yoshida T, Kurihara T, Hirasawa M, Ozeki N, et al. Retinal ganglion cell loss in superoxide dismutase 1 deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4143-50.
141. Chen B, Caballero S, Seo S, Grant MB, Lewin AS. Delivery of antioxidant enzyme genes to protect against ischemia/reperfusion-induced injury to retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(12):5587-95.
142. Dong A, Shen J, Krause M, Akiyama H, Hackett SF, Lai H, et al. Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage. *Journal of cellular physiology*. 2006;208(3):516-26.
143. Huang HF, Guo F, Cao YZ, Shi W, Xia Q. Neuroprotection by manganese superoxide dismutase (MnSOD) mimics: antioxidant effect and oxidative stress regulation in acute experimental stroke. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2012;18(10):811-8.
144. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9782-7.
145. Tischfield JA, Creagan RP, Ricciuti F, Ruddle FH. Proceedings: Assignment of the gene in man for mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. *Cytogenetics and cell genetics*. 1974;13(1):164-6.
146. Sasaki T, Shimizu T, Koyama T, Sakai M, Uchiyama S, Kawakami S, et al. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *Journal of neuroscience research*. 2011;89(4):601-10.
147. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics*. 1995;11(4):376-81.

148. Schultz R, Witte OW, Schmeer C. Increased Frataxin Levels Protect Retinal Ganglion Cells After Acute Ischemia/Reperfusion in the Mouse Retina In Vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(10):4115-24.
149. Scortegagna M1 DK, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet.* 2003;35(4):331-40.
150. Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, et al. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circulation research.* 2005;96(7):723-9.
151. Naganuma T, Nakayama T, Sato N, Fu Z, Soma M, Aoi N, et al. Association of extracellular superoxide dismutase gene with cerebral infarction in women: a haplotype-based case-control study. *Hereditas.* 2008;145(6):283-92.
152. Adachi T, Aida K, Nishihara H, Kamiya T, Hara H. Effect of hypoxia mimetic cobalt chloride on the expression of extracellular-superoxide dismutase in retinal pericytes. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 2011;34(8):1297-300.
153. Break TJ, Jun S, Indramohan M, Carr KD, Sieve AN, Dory L, et al. Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2012;188(7):3342-50.
154. Zaghloul N, Patel H, Codipilly C, Marambaud P, Dewey S, Frattini S, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects against brain injury induced by chronic hypoxia. *PloS one.* 2014;9(9):e108168.
155. Loew O. A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science (New York, NY).* 1900;11:701-2.
156. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J. The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environmental health perspectives.* 1998;106 Suppl 5:1219-28.
157. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS.* 2004;61(2):192-208.
158. Nicholls P, Fita I, Loewen PC. Enzymology and structure of catalases. *Advances in Inorganic Chemistry.* 2000;51:51-106.
159. Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology.* 1999;72(1):19-66.

160. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*. 2010;1(10):888-97.
161. Beyer WF, Jr., Fridovich I. Catalases--with and without heme. *Basic life sciences*. 1988;49:651-61.
162. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(1):44-50.
163. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free radical biology & medicine*. 2015;87:84-97.
164. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1203:120-5.
165. Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(25):22432-6.
166. Armogida M, Spalloni A, Amantea D, Nutini M, Petrelli F, Longone P, et al. The protective role of catalase against cerebral ischemia in vitro and in vivo. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2011;24(3):735-47.
167. Jung HY, Kim DW, Yim HS, Yoo DY, Kim JW, Won MH, et al. Heme Oxygenase-1 Protects Neurons from Ischemic Damage by Upregulating Expression of Cu,Zn-Superoxide Dismutase, Catalase, and Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rabbit Spinal Cord. *Neurochemical research*. 2016;41(4):869-79.
168. Tate DJ, Jr., Miceli MV, Newsome DA. Zinc induces catalase expression in cultured fetal human retinal pigment epithelial cells. *Current eye research*. 1997;16(10):1017-23.
169. Okuno Y, Matsuda M, Miyata Y, Fukuhara A, Komuro R, Shimabukuro M, et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocrine journal*. 2010;57(4):303-9.
170. Chen B, Tang L. Protective effects of catalase on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Experimental eye research*. 2011;93(5):599-606.
171. Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, Chung KF. TGF-beta regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(2):L295-304.

172. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3217-66.
173. Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(11):1486-500.
174. Mills GC. Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin. 1957.
175. Crack PJ, Taylor JM, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC, et al. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. *J Neurochem*. 2001;78(6):1389-99.
176. Crack PJ, Taylor JM, de Haan JB, Kola I, Hertzog P, Iannello RC. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-1 transgenic mouse in response to ischemia/reperfusion injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(1):19-22.
177. Lei XG, Cheng WH. New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *The Journal of nutrition*. 2005;135(10):2295-8.
178. Prabhakar R, Morokuma K, Musaev DG. Peroxynitrite reductase activity of selenoprotein glutathione peroxidase: a computational study. *Biochemistry*. 2006;45(22):6967-77.
179. Wong CH, Bozinovski S, Hertzog PJ, Hickey MJ, Crack PJ. Absence of glutathione peroxidase-1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing post-ischemic microvascular perfusion. *J Neurochem*. 2008;107(1):241-52.
180. Arteel GE, Briviba K, Sies H. Protection against peroxynitrite. *FEBS letters*. 1999;445(2-3):226-30.
181. Foresti R, Motterlini R. The heme oxygenase pathway and its interaction with nitric oxide in the control of cellular homeostasis. *Free radical research*. 1999;31(6):459-75.
182. Mancuso C. Heme oxygenase and its products in the nervous system. *Antioxidants & redox signaling*. 2004;6(5):878-87.
183. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;338(1):558-67.

184. Wilks A. Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. *Antioxidants & redox signaling*. 2002;4(4):603-14.
185. Nishimura RN, Dwyer BE, Lu SY. Localization of heme oxygenase in rat retina: effect of light adaptation. *Neuroscience letters*. 1996;205(1):13-6.
186. Szabo ME, Gallyas E, Bak I, Rakotovao A, Boucher F, de Leiris J, et al. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide and flavonoids in ischemic/reperfused rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(10):3727-32.
187. Liu Q, Ju WK, Crowston JG, Xie F, Perry G, Smith MA, et al. Oxidative stress is an early event in hydrostatic pressure induced retinal ganglion cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(10):4580-9.
188. Peng PH, Chao HM, Juan SH, Chen CF, Liu JH, Ko ML. Pharmacological preconditioning by low dose cobalt protoporphyrin induces heme oxygenase-1 overexpression and alleviates retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Current eye research*. 2011;36(3):238-46.
189. Schuller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nature structural biology*. 1999;6(9):860-7.
190. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(23):6388-94.
191. Wilks A, Heinzl G. Heme oxygenation and the widening paradigm of heme degradation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;544:87-95.
192. Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free radical biology & medicine*. 2018;117:76-89.
193. Gazaryan IG, Thomas B. The status of Nrf2-based therapeutics: current perspectives and future prospects. *Neural regeneration research*. 2016;11(11):1708-11.
194. He M, Pan H, Xiao C, Pu M. Roles for redox signaling by NADPH oxidase in hyperglycemia-induced heme oxygenase-1 expression in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(6):4092-101.
195. Hui Q, Karlstetter M, Xu Z, Yang J, Zhou L, Eilken HM, et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine*. 2020;146:181-8.
196. Radhakrishnan N, Yadav SP, Sachdeva A, Pruthi PK, Sawhney S, Piplani T, et al. Human heme oxygenase-1 deficiency presenting with hemolysis, nephritis, and asplenia. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011;33(1):74-8.

197. Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1995;352(4):351-64.
198. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(9):5147-59.
199. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in neurosciences*. 1997;20(3):132-9.
200. Celiker U, Ilhan N. Nitric oxide and octreotide in retinal ischemia-reperfusion injury. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 2002;105(3):327-38.
201. Neufeld AH, Shareef S, Pena J. Cellular localization of neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) in the human and rat retina. *The Journal of comparative neurology*. 2000;416(2):269-75.
202. Vielma AH, Retamal MA, Schmachtenberg O. Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? *Brain research*. 2012;1430:112-25.
203. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*. 2001;357(Pt 3):593-615.
204. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical journal*. 1994;298 (Pt 2):249-58.
205. Mansuy D, Boucher JL. Alternative nitric oxide-producing substrates for NO synthases. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(8):1105-21.
206. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1994;23(6 Pt 2):1121-31.
207. Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994;78(6):927-30.
208. Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Xu H, Yao Y, Horke S, Forstermann U, et al. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2007;322(2):836-42.
209. Qian LB, Fu JY, Cai X, Xia ML. Betulinic acid inhibits superoxide anion-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortas. *Indian journal of pharmacology*. 2012;44(5):588-92.
210. Agurto A, Vielma AH, Cadiz B, Couve E, Schmachtenberg O. NO signaling in retinal bipolar cells. *Experimental eye research*. 2017;161:30-5.

211. Zhang M, Zhou J, Marshall B, Xin H, Atherton SS. Lack of iNOS facilitates MCMV spread in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(1):285-92.
212. Schmetterer L, Polak K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Progress in retinal and eye research.* 2001;20(6):823-47.
213. Blom J, Giove T, Deshpande M, Eldred WD. Characterization of nitric oxide signaling pathways in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology.* 2012;520(18):4204-17.
214. Kim IB, Oh SJ, Chun MH. Neuronal nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the mammalian retina. *Microscopy research and technique.* 2000;50(2):112-23.
215. Lima MG, Maximino C, Matos Oliveira KR, Brasil A, Crespo-Lopez ME, Batista Ede J, et al. Nitric oxide as a regulatory molecule in the processing of the visual stimulus. *Nitric Oxide.* 2014;36:44-50.
216. Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R, Tokoro T. Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Japanese journal of ophthalmology.* 2000;44(3):235-44.
217. Pang JJ, Gao F, Wu SM. Light responses and morphology of bNOS-immunoreactive neurons in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology.* 2010;518(13):2456-74.
218. Giove TJ, Deshpande MM, Eldred WD. Identification of alternate transcripts of neuronal nitric oxide synthase in the mouse retina. *Journal of neuroscience research.* 2009;87(14):3134-42.
219. Masland RH. The tasks of amacrine cells. *Visual neuroscience.* 2012;29(1):3-9.
220. Perez De Sevilla Muller L, Shelley J, Weiler R. Displaced amacrine cells of the mouse retina. *The Journal of comparative neurology.* 2007;505(2):177-89.
221. Curcio CA, Allen KA. Topography of ganglion cells in human retina. *The Journal of comparative neurology.* 1990;300(1):5-25.
222. Giove TJ, Deshpande MM, Gagen CS, Eldred WD. Increased neuronal nitric oxide synthase activity in retinal neurons in early diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2009;15:2249-58.
223. Koriyama Y, Hisano S, Ogai K, Sugitani K, Furukawa A, Kato S. Involvement of neuronal nitric oxide synthase in N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *Journal of pharmacological sciences.* 2015;127(3):394-6.

224. Maynard KI, Chen D, Arango PM, Ogilvy CS. Nitric oxide produced during ischemia improves functional recovery in the rabbit retina. *Neuroreport*. 1996;8(1):81-5.
225. Schmidt R, Lang F. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie ; mit 77 Tabellen* 30 ed: Heidelberg : Springer 2007 2007. 1030 S. p.
226. Hangai M, Yoshimura N, Hiroi K, Mandai M, Honda Y. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Experimental eye research*. 1996;63(5):501-9.
227. Johnson EC, Morrison JC. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma*. 2009;18(5):341-53.
228. Piehl L, Capani F, Facorro G, Lopez EM, de Celis ER, Pustovrh C, et al. Nitric oxide increases in the rat retina after continuous illumination. *Brain research*. 2007;1156:112-9.
229. Stefano GB, Kream RM. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(10):Ra221-6.
230. Husain S, Abdul Y, Singh S, Ahmad A, Husain M. Regulation of nitric oxide production by delta-opioid receptors during glaucomatous injury. *PloS one*. 2014;9(10):e110397.
231. Oku H, Yamaguchi H, Sugiyama T, Kojima S, Ota M, Azuma I. Retinal toxicity of nitric oxide released by administration of a nitric oxide donor in the albino rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(12):2540-4.
232. Portillo JA, Van Grol J, Zheng L, Okenka G, Gentil K, Garland A, et al. CD40 mediates retinal inflammation and neurovascular degeneration. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(12):8719-26.
233. Xu Z, Cho H, Hartsock MJ, Mitchell KL, Gong J, Wu L, et al. Neuroprotective role of Nrf2 for retinal ganglion cells in ischemia-reperfusion. *J Neurochem*. 2015;133(2):233-41.
234. Hardy P, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatric research*. 1996;39(3):487-93.
235. Ali-Seyed M, Jantan I, Vijayaraghavan K, Bukhari SN. Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms

- of a Promising Anticancer Therapy. *Chemical biology & drug design*. 2016;87(4):517-36.
236. Fulda S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(1):140-6.
237. Khan MF, Nahar N, Rashid RB, Chowdhury A, Rashid MA. Computational investigations of physicochemical, pharmacokinetic, toxicological properties and molecular docking of betulinic acid, a constituent of *Corypha taliera* (Roxb.) with Phospholipase A2 (PLA2). *BMC complementary and alternative medicine*. 2018;18(1):48.
238. Saneja A, Arora D, Kumar R, Dubey RD, Panda AK, Gupta PN. Therapeutic applications of betulinic acid nanoformulations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018.
239. Silva FS, Oliveira PJ, Duarte MF. Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion? *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016;64(15):2991-3008.
240. Sousa JL, Freire CS, Silvestre AJ, Silva A. Recent Developments in the Functionalization of Betulinic Acid and Its Natural Analogues: A Route to New Bioactive Compounds. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019;24(2):355.
241. Gheorgheosu D, Duicu O, Dehelean C, Soica C, Muntean D. Betulinic acid as a potent and complex antitumor phytochemical: a minireview. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2014;14(7):936-45.
242. Godugu C, Patel AR, Doddapaneni R, Somagoni J, Singh M. Approaches to improve the oral bioavailability and effects of novel anticancer drugs berberine and betulinic acid. *PloS one*. 2014;9(3):e89919.
243. Rios JL, Manez S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta medica*. 2018;84(1):8-19.
244. Yogeewari P, Sriram D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem*. 2005;12(6):657-66.
245. Cheng X, Shin YG, Levine BS, Smith AC, Tomaszewski JE, van Breemen RB. Quantitative analysis of betulinic acid in mouse, rat and dog plasma using electrospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2003;17(18):2089-92.
246. Blazeovski J, Petkovic F, Momcilovic M, Paschke R, Kaluderovic GN, Mostarica Stojkovic M, et al. Betulinic acid regulates generation of neuroinflammatory mediators

- responsible for tissue destruction in multiple sclerosis in vitro. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(3):424-31.
247. Kaur R, Arora S. Interactions of betulinic acid with xenobiotic metabolizing and antioxidative enzymes in DMBA-treated Sprague Dawley female rats. *Free radical biology & medicine*. 2013;65:131-42.
248. Nader MA, Baraka HN. Effect of betulinic acid on neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression in lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2012;46(1-2):106-13.
249. Peng J, Lv YC, He PP, Tang YY, Xie W, Liu XY, et al. Betulinic acid downregulates expression of oxidative stress-induced lipoprotein lipase via the PKC/ERK/c-Fos pathway in RAW264.7 macrophages. *Biochimie*. 2015;119:192-203.
250. Rastogi S, Pandey MM, Kumar Singh Rawat A. Medicinal plants of the genus *Betula*--traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;159:62-83.
251. Wang D, Chen P, Chen L, Zeng F, Zang R, Liu H, et al. Betulinic acid protects the neuronal damage in new born rats from isoflurane-induced apoptosis in the developing brain by blocking FASL-FAS signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;95:1631-5.
252. Fu JY, Qian LB, Zhu LG, Liang HT, Tan YN, Lu HT, et al. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in L-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2011;44(3):385-91.
253. Lu P, Zhang CC, Zhang XM, Li HG, Luo AL, Tian YK, et al. Down-regulation of NOX4 by betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2017;37(5):744-9.
254. Muceniece R, Saleniece K, Rumaks J, Krigere L, Dzirkale Z, Mezhapuke R, et al. Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2008;90(4):712-6.
255. Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(1):1-13.

256. Udeani GO, Zhao GM, Geun Shin Y, Cooke BP, Graham J, Beecher CW, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 1999;20(8):379-83.
257. Yi J, Xia W, Wu J, Yuan L, Wu J, Tu D, et al. Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice. *Journal of veterinary science*. 2014;15(1):141-8.
258. Akowuah GA, Zhari I. Determination of betulinic acid from *Orthosiphon stamineus* leaf extract in rat plasma. *Die Pharmazie*. 2008;63(11):788-90.
259. Baur-Müller B. Funktionskreis Niere/Blase. *Westliche Heilpflanzen in der chinesischen Medizin: Von der Musterdiagnose zur Rezeptur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 151-221.
260. Chen JK, Englert S, Flechtner A-R, Focks C, Neeb G, Li T, et al. 7 - Chinesische Arzneitherapie. *Leitfaden Chinesische Medizin (6 Auflage)*. Munich: Urban & Fischer; 2010. p. 549-765.
261. Li Y, Guo S, Hua T, Wang Y, Wei D, Zhao M, et al. Comparative pharmacokinetics of triterpenic acids in normal and immunosuppressed rats after oral administration of *Jujubae Fructus* extract by UPLC-MS/MS. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2018;1077-1078:13-21.
262. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nature medicine*. 1995;1(10):1046-51.
263. Fujioka T, Kashiwada Y, Kilkuskie RE, Cosentino LM, Ballas LM, Jiang JB, et al. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *Journal of natural products*. 1994;57(2):243-7.
264. Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Ramachandra HD, Bhat RA, et al. Betulinic acid attenuates renal oxidative stress and inflammation in experimental model of murine polymicrobial sepsis. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2015;70:12-21.
265. Yi J, Zhu R, Wu J, Wu J, Tan Z. Ameliorative effect of betulinic acid on oxidative damage and apoptosis in the splenocytes of dexamethasone treated mice. *International immunopharmacology*. 2015;27(1):85-94.

266. Laavola M, Haavikko R, Hamalainen M, Leppanen T, Nieminen R, Alakurtti S, et al. Betulin Derivatives Effectively Suppress Inflammation in Vitro and in Vivo. *Journal of natural products*. 2016;79(2):274-80.
267. Oloyede HOB, Ajiboye HO, Salawu MO, Ajiboye TO. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microbial pathogenesis*. 2017;111:338-44.
268. Rajendran P, Jaggi M, Singh MK, Mukherjee R, Burman AC. Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity. *Investigational new drugs*. 2008;26(1):25-34.
269. Lu Q, Xia N, Xu H, Guo L, Wenzel P, Daiber A, et al. Betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by reducing oxidative and nitrosative stress. *Nitric Oxide*. 2011;24(3):132-8.
270. Lingaraju MC, Pathak NN, Begum J, Balaganur V, Bhat RA, Ram M, et al. Betulinic acid negates oxidative lung injury in surgical sepsis model. *The Journal of surgical research*. 2015;193(2):856-67.
271. Abubakar S, Al-Mansoub MA, Murugaiyah V, Chan KL. The phytochemical and anti-inflammatory studies of *Dillenia suffruticosa* leaves. *Phytotherapy research : PTR*. 2019.
272. Fujita R, Ueda M, Fujiwara K, Ueda H. Prothymosin-alpha plays a defensive role in retinal ischemia through necrosis and apoptosis inhibition. *Cell death and differentiation*. 2009;16(2):349-58.
273. Masuda T, Shimazawa M, Ishizuka F, Nakamura S, Tsuruma K, Hara H. Tissue kallikrein (kallidinogenase) protects against retinal ischemic damage in mice. *European journal of pharmacology*. 2014;738:74-82.
274. Li H, Zhu X, Fang F, Jiang D, Tang L. Down-regulation of GRP78 enhances apoptosis via CHOP pathway in retinal ischemia-reperfusion injury. *Neuroscience letters*. 2014;575:68-73.
275. Liu Y, Tang L, Chen B. Effects of antioxidant gene therapy on retinal neurons and oxidative stress in a model of retinal ischemia/reperfusion. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(5):909-15.
276. Tenkumo K, Hirooka K, Sherajee SJ, Nakamura T, Itano T, Nitta E, et al. Effect of the renin inhibitor aliskiren against retinal ischemia-reperfusion injury. *Experimental eye research*. 2014;122:110-8.

277. Cheon EW, Park CH, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, et al. Change in endothelial nitric oxide synthase in the rat retina following transient ischemia. *Neuroreport*. 2003;14(3):329-33.
278. Kim KY, Perkins GA, Shim MS, Bushong E, Alcasid N, Ju S, et al. DRP1 inhibition rescues retinal ganglion cells and their axons by preserving mitochondrial integrity in a mouse model of glaucoma. *Cell death & disease*. 2015;6:e1839.
279. Lee D, Kim KY, Shim MS, Kim SY, Ellisman MH, Weinreb RN, et al. Coenzyme Q10 ameliorates oxidative stress and prevents mitochondrial alteration in ischemic retinal injury. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2014;19(4):603-14.
280. Jackman KA, Miller AA, De Silva TM, Crack PJ, Drummond GR, Sobey CG. Reduction of cerebral infarct volume by apocynin requires pretreatment and is absent in Nox2-deficient mice. *British journal of pharmacology*. 2009;156(4):680-8.
281. Qiu Y, Yang H, Lei B. Effects of three commonly used anesthetics on intraocular pressure in mouse. *Current eye research*. 2014;39(4):365-9.
282. Alsarraf O, Fan J, Dahrouj M, Chou CJ, Menick DR, Crosson CE. Acetylation: a lysine modification with neuroprotective effects in ischemic retinal degeneration. *Experimental eye research*. 2014;127:124-31.
283. Nayak MS, Kita M, Marmor MF. Protection of rabbit retina from ischemic injury by superoxide dismutase and catalase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(6):2018-22.
284. Allcutt D, Berry M, Sievers J. A quantitative comparison of the reactions of retinal ganglion cells to optic nerve crush in neonatal and adult mice. *Developmental Brain Research*. 1984;16(2):219-30.
285. Schmidt TM, Kofuji P. An Isolated Retinal Preparation to Record Light Response from Genetically Labeled Retinal Ganglion Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(47):2367.
286. Tu HY, Hsu CC, Chen YJ, Chen CK. Patch Clamp Recording of Starburst Amacrine Cells in a Flat-mount Preparation of Deafferented Mouse Retina. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2016(116).
287. Gramlich OW, Joachim SC, Gottschling PF, Laspas P, Cuny CS, Pfeiffer N, et al. Ophthalmopathology in rats with MBP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2011;249(7):1009-20.

288. Stone J. A quantitative analysis of the distribution of ganglion cells in the cat's retina. *The Journal of comparative neurology*. 1965;124(3):337-52.
289. Lang G. Histologische Färbung. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 169-250.
290. Gilani AG, Hosseini SE, Moghadam M, Alizadeh E. Excited state electric dipole moment of Nile blue and Brilliant Cresyl Blue: a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012;89:231-7.
291. Hejazi MS, Raof JB, Ojani R, Golabi SM, Asl EH. Brilliant Cresyl Blue as electroactive indicator in electrochemical DNA oligonucleotide sensors. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*. 2010;78(2):141-6.
292. Beemer AM, Bubis S. CRESYL BLUE AND CRESYL BLUE PLUS SUDAN 3 AS STAINS FOR USE IN EXFOLIATIVE AND OTHER CYTOLOGY. *Bulletin of the World Health Organization*. 1964;31:865-8.
293. Herndon RM. The fine structure of the Purkinje cell. *The Journal of cell biology*. 1963;18:167-80.
294. Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM. THE AXON HILLOCK AND THE INITIAL SEGMENT. *The Journal of cell biology*. 1968;38(1):193-201.
295. Laspas P, Sniatecki JJ, Brochhausen C, Steege A, Goloborodko E, Kordasz ML, et al. Effect of the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor on Retinal Neuron Number Studied with Gene-Targeted Mice. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2015;56(2):472-9.
296. Lang G. Fixierung. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 47-77.
297. Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*. 2012;16(2):251-5.
298. Lang G. Mikrotomie. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 133-67.
299. Kalyanaraman B, Hardy M, Podsiadly R, Cheng G, Zielonka J. Recent developments in detection of superoxide radical anion and hydrogen peroxide: Opportunities, challenges, and implications in redox signaling. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2017;617:38-47.
300. Owusu-Ansah E, Yavari A, Banerjee U. A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species: Springer Nature © 2018 Nature Publishing Group, a division

of Macmillan Publishers Limited; 2008 [cited 2018 March 13]. Available from:
<https://www.nature.com/protocolexchange/protocols/414>.

301. Brismar H, Trepte O, Ulfhake B. Spectra and fluorescence lifetimes of lissamine rhodamine, tetramethylrhodamine isothiocyanate, texas red, and cyanine 3.18 fluorophores: influences of some environmental factors recorded with a confocal laser scanning microscope. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1995;43(7):699-707.

302. Hughes S, Moody A. PCR. Hughes S, Moody A, editors. Bloxham: Scion Publishing Limited; 2007.

303. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(63):e3998.

304. Agardh CD, Israelsson B, Thuesen-Olesen B, Agardh E. Application of quantitative competitive polymerase chain reaction for measurements of mRNA from antioxidative enzymes in the diabetic rat retina and kidney. *Metabolism: clinical and experimental*. 2002;51(10):1279-84.

305. Lang G. In-situ-Hybridisierung. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Vienna: Springer Vienna; 2013. p. 305-22.

306. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*. 2004;32(12):e103.

307. Eksioglu-Demiralp E, Kardas ER, Ozgul S, Yagci T, Bilgin H, Sehirli O, et al. Betulinic acid protects against ischemia/reperfusion-induced renal damage and inhibits leukocyte apoptosis. *Phytotherapy research : PTR*. 2010;24(3):325-32.

308. Xia A, Xue Z, Li Y, Wang W, Xia J, Wei T, et al. Cardioprotective effect of betulinic Acid on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2014;2014:573745.

309. Jiao S, Zhu H, He P, Teng J. Betulinic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2016;84:1533-7.

310. Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance. *Clinical therapeutics*. 2001;23(8):1296-310.

311. Dvorianchikova G, Barakat DJ, Hernandez E, Shestopalov VI, Ivanov D. Liposome-delivered ATP effectively protects the retina against ischemia-reperfusion injury. *Mol Vis*. 2010;16:2882-90.
312. Muniz JA, de Athaide LM, Gomes BD, Finlay BL, Silveira LC. Ganglion cell and displaced amacrine cell density distribution in the retina of the howler monkey (*Alouatta caraya*). *PloS one*. 2014;9(12):e115291.
313. Peng PH, Ko ML, Chen CF. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity. *Experimental eye research*. 2008;86(4):637-46.
314. Fukuda K, Hirooka K, Mizote M, Nakamura T, Itano T, Shiraga F. Neuroprotection against retinal ischemia-reperfusion injury by blocking the angiotensin II type 1 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(7):3629-38.
315. Pan H, He M, Liu R, Brecha NC, Yu AC, Pu M. Sulforaphane protects rodent retinas against ischemia-reperfusion injury through the activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway. *PloS one*. 2014;9(12):e114186.
316. Shimouchi A, Yokota H, Ono S, Matsumoto C, Tamai T, Takumi H, et al. Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. *Japanese journal of ophthalmology*. 2015.
317. Fujita T, Hirooka K, Nakamura T, Itano T, Nishiyama A, Nagai Y, et al. Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1-R) blocker via modulating AT1-R signaling and decreased extracellular glutamate levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(7):4099-110.
318. Gao J, Liu R, Wu J, Liu Z, Li J, Zhou J, et al. The use of chitosan based hydrogel for enhancing the therapeutic benefits of adipose-derived MSCs for acute kidney injury. *Biomaterials*. 2012;33(14):3673-81.
319. Mital R, Zhang W, Cai M, Huttinger ZM, Goodman LA, Wheeler DG, et al. Antioxidant network expression abrogates oxidative posttranslational modifications in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2011;300(5):H1960-70.
320. Obana M, Miyamoto K, Murasawa S, Iwakura T, Hayama A, Yamashita T, et al. Therapeutic administration of IL-11 exhibits the postconditioning effects against ischemia-reperfusion injury via STAT3 in the heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;303(5):H569-77.
321. Versteilen AM, Korstjens IJ, Musters RJ, Groeneveld AB, Sipkema P. Role of cyclooxygenase and derived reactive oxygen species in rho-kinase-mediated

- impairment of endothelium-dependent vasodilation and blood flow after ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Nephron Experimental nephrology*. 2010;114(1):e1-6.
322. Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, et al. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *Journal of vascular surgery*. 2013;57(4):1100-8.e2.
323. Kahles T, Kohnen A, Heumueller S, Rappert A, Bechmann I, Liebner S, et al. NADPH oxidase Nox1 contributes to ischemic injury in experimental stroke in mice. *Neurobiology of disease*. 2010;40(1):185-92.
324. Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, Armitage ME, Jones E, Mittal M, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS biology*. 2010;8(9).
325. Schmidt HH, Wingler K, Kleinschnitz C, Disting G. NOX4 is a Janus-faced reactive oxygen species generating NADPH oxidase. *Circulation research*. 2012;111(1):e15-e6.
326. Nlandu-Khodo S, Dissard R, Hasler U, Schafer M, Pircher H, Jansen-Durr P, et al. NADPH oxidase 4 deficiency increases tubular cell death during acute ischemic reperfusion injury. *Scientific reports*. 2016;6:38598.
327. Chen FT, Yang CM, Yang CH. The protective effects of the proteasome inhibitor bortezomib (velcade) on ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *PloS one*. 2013;8(5):e64262.
328. Dvorientchikova G, Santos AR, Danek D, Dvorientchikova X, Ivanov D. The TIR-domain-containing adapter inducing interferon-beta-dependent signaling cascade plays a crucial role in ischemia-reperfusion-induced retinal injury, whereas the contribution of the myeloid differentiation primary response 88-dependent signaling cascade is not as pivotal. *Eur J Neurosci*. 2014;40(3):2502-12.
329. Walton MR, Gibbons H, MacGibbon GA, Sirimanne E, Saura J, Gluckman PD, et al. PU.1 expression in microglia. *Journal of neuroimmunology*. 2000;104(2):109-15.
330. Pendyala S, Moitra J, Kalari S, Kleeberger SR, Zhao Y, Reddy SP, et al. Nrf2 regulates hyperoxia-induced Nox4 expression in human lung endothelium: identification of functional antioxidant response elements on the Nox4 promoter. *Free radical biology & medicine*. 2011;50(12):1749-59.

331. Crutzen R, Shlyonsky V, Louchami K, Virreira M, Hupkens E, Boom A, et al. Does NAD(P)H oxidase-derived H₂O₂ participate in hypotonicity-induced insulin release by activating VRAC in beta-cells? *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2012;463(2):377-90.
332. Kim KS, Lee DS, Kim DC, Yoon CS, Ko W, Oh H, et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from *Diospyros kaki* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(9).
333. Kovac S, Angelova PR, Holmstrom KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1850(4):794-801.
334. Song Y, Wang LB, Bei Y, Qin DX, Ai LY, Ma QZ, et al. Carvacryl acetate, a semisynthetic monoterpene ester obtained from essential oils, provides neuroprotection against cerebral ischemia reperfusion-induced oxidative stress injury via the Nrf2 signalling pathway. *Food & function*. 2020;11(2):1754-63.
335. Wang J, Zhang W, Lv C, Wang Y, Ma B, Zhang H, et al. A novel biscoumarin compound ameliorates cerebral ischemia reperfusion-induced mitochondrial oxidative injury via Nrf2/Keap1/ARE signaling. *Neuropharmacology*. 2020;167:107918.
336. Hou W, Zhu X, Liu J, Map J. Inhibition of miR-153 ameliorates ischemia/reperfusion-induced cardiomyocytes apoptosis by regulating Nrf2/HO-1 signaling in rats. *Biomedical engineering online*. 2020;19(1):15.
337. Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, et al. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience*. 2005;132(2):233-8.
338. Neurologie DGf. Kapitel Vaskuläre Erkrankungen - Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls (S1 - Leitlinie) Stuttgart: Thieme Verlag; 2012 Sept [updated 2012; cited 2018 26 Apr]. Available from: https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/ll_22_2012_akuttherapie_des_ischmischen_schlaganfalls_update.pdf.
339. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Yoshimoto T, Chan PH. Superoxide during reperfusion contributes to caspase-8 expression and apoptosis after transient focal stroke. *Stroke*. 2001;32(10):2356-61.

340. Sheng H, Bart RD, Oury TD, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 1999;88(1):185-91.
341. Sheng H, Kudo M, Mackensen GB, Pearlstein RD, Crapo JD, Warner DS. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to global cerebral ischemia. *Experimental neurology*. 2000;163(2):392-8.
342. Ozdemir G, Inanc F. Zinc may protect remote ocular injury caused by intestinal ischemia reperfusion in rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2005;206(3):247-51.
343. Guo Y, Chen ZW. Protective effects of total flavones of rhododendra on cerebral ischemia reperfusion injury. *The American journal of Chinese medicine*. 2008;36(2):343-54.
344. Heeba GH, El-Hanafy AA. Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Life sciences*. 2012;90(11-12):388-95.
345. Schultz R, Krug M, Precht M, Wohl SG, Witte OW, Schmeer C. Frataxin overexpression in Muller cells protects retinal ganglion cells in a mouse model of ischemia/reperfusion injury in vivo. *Scientific reports*. 2018;8(1):4846.
346. Dibas A, Millar C, Al-Farra A, Yorio T. Neuroprotective Effects of Psalmotoxin-1, an Acid-Sensing Ion Channel (ASIC) Inhibitor, in Ischemia Reperfusion in Mouse Eyes. *Current eye research*. 2018:1-13.
347. Zeng XS, Zhou XS, Luo FC, Jia JJ, Qi L, Yang ZX, et al. Comparative analysis of the neuroprotective effects of ginsenosides Rg1 and Rb1 extracted from *Panax notoginseng* against cerebral ischemia. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2014;92(2):102-8.
348. Aguilera P, Chanez-Cardenas ME, Ortiz-Plata A, Leon-Aparicio D, Barrera D, Espinoza-Rojo M, et al. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2010;17(3-4):241-7.
349. Fukui S, Nawashiro H, Ookawara T, Suzuki K, Otani N, Ooigawa H, et al. Extracellular superoxide dismutase following cerebral ischemia in mice. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2003;86:83-5.

350. Fukui S, Ookawara T, Nawashiro H, Suzuki K, Shima K. Post-ischemic transcriptional and translational responses of EC-SOD in mouse brain and serum. *Free radical biology & medicine*. 2002;32(3):289-98.
351. Mao XW, Green LM, Mekonnen T, Lindsey N, Gridley DS. Gene expression analysis of oxidative stress and apoptosis in proton-irradiated rat retina. *In vivo* (Athens, Greece). 2010;24(4):425-30.
352. Hollis A, Sperl B, Graber M, Berg T. The natural product betulinic acid inhibits C/EBP family transcription factors. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2012;13(2):302-7.
353. Fulda S. Betulinic Acid for cancer treatment and prevention. *International journal of molecular sciences*. 2008;9(6):1096-107.
354. Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer research*. 2007;67(6):2816-23.
355. Safe S, Kasiappan R. Natural Products as Mechanism-based Anticancer Agents: Sp Transcription Factors as Targets. *Phytotherapy research : PTR*. 2016;30(11):1723-32.
356. Tzenov YR, Andrews P, Voisey K, Gai L, Carter B, Whelan K, et al. Selective estrogen receptor modulators and betulinic acid act synergistically to target ERalpha and SP1 transcription factor dependent Pygopus expression in breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2016;69(6):518-26.
357. Hsu TI, Wang MC, Chen SY, Huang ST, Yeh YM, Su WC, et al. Betulinic acid decreases specificity protein 1 (Sp1) level via increasing the sumoylation of sp1 to inhibit lung cancer growth. *Molecular pharmacology*. 2012;82(6):1115-28.
358. Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, Kalluri H, Johnson PF, Vemuganti R. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem*. 2006;98(6):1718-31.
359. Ayyar K, Reddy KVR. Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein-beta upregulates microRNA, let-7f-1 in human endocervical cells. *American journal of reproductive immunology (New York, NY : 1989)*. 2017;78(6).
360. Yang J, Qiu B, Li X, Zhang H, Liu W. p53-p66(shc)/miR-21-Sod2 signaling is critical for the inhibitory effect of betulinic acid on hepatocellular carcinoma. *Toxicology letters*. 2015;238(3):1-10.

361. Yao D, Li H, Gou Y, Zhang H, Vlessidis AG, Zhou H, et al. Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. *The FEBS journal*. 2009;276(9):2599-614.
362. Li L, Du G, Wang D, Zhou J, Jiang G, Jiang H. Overexpression of Heme Oxygenase-1 in Mesenchymal Stem Cells Augments Their Protection on Retinal Cells In Vitro and Attenuates Retinal Ischemia/Reperfusion Injury In Vivo against Oxidative Stress. *Stem cells international*. 2017;2017:4985323.
363. Yuan L, Liao PP, Song HC, Zhou JH, Chu HC, Lyu L. Hyperbilirubinemia Induces Pro-Apoptotic Effects and Aggravates Renal Ischemia Reperfusion Injury. *Nephron*. 2019:1-11.
364. Varga B, Gesztelyi R, Bombicz M, Haines D, Szabo AM, Kemeny-Beke A, et al. Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2013;50(3):558-70.
365. Dash SK, Chattopadhyay S, Ghosh T, Dash SS, Tripathy S, Das B, et al. Self-assembled betulinic acid protects doxorubicin induced apoptosis followed by reduction of ROS-TNF-alpha-caspase-3 activity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2015;72:144-57.
366. Martitz J, Becker NP, Renko K, Stoedter M, Hybsier S, Schomburg L. Gene-specific regulation of hepatic selenoprotein expression by interleukin-6. *Metallomics : integrated biometal science*. 2015;7(11):1515-21.
367. Blum NM, Mueller K, Lippmann D, Metges CC, Linn T, Pallauf J, et al. Feeding of selenium alone or in combination with glucoraphanin differentially affects intestinal and hepatic antioxidant and phase II enzymes in growing rats. *Biological trace element research*. 2013;151(3):384-99.
368. Lu YF, Liu J, Wu KC, Qu Q, Fan F, Klaassen CD. Overexpression of Nrf2 protects against microcystin-induced hepatotoxicity in mice. *PloS one*. 2014;9(3):e93013.
369. Kunwar A, Verma P, Bhilwade HN, Iwaoka M, Priyadarsini KI. Dihydroxyselenolane (DHS) supplementation improves survival following whole-body irradiation (WBI) by suppressing tissue-specific inflammatory responses. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2016;807:33-46.
370. Ohtsuka Y, Ikegami T, Izumi H, Namura M, Ikeda T, Ikuse T, et al. Effects of *Bifidobacterium breve* on inflammatory gene expression in neonatal and weaning rat intestine. *Pediatric research*. 2012;71(1):46-53.

371. Gosbell AD, Stefanovic N, Scurr LL, Pete J, Kola I, Favilla I, et al. Retinal light damage: structural and functional effects of the antioxidant glutathione peroxidase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(6):2613-22.
372. Ekuadzi E, Biney RP, Benneh CK, Osei Amankwaa B, Jato J. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan-induced pleurisy model of lung inflammation in mice. *Phytotherapy research : PTR.* 2018;32(3):480-7.
373. Sutariya B, Taneja N, Saraf M. Betulinic acid, isolated from the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels, ameliorates the proteinuria in experimental membranous nephropathy through regulating Nrf2/NF-kappaB pathways. *Chemico-biological interactions.* 2017;274:124-37.
374. Xie R, Zhang H, Wang XZ, Yang XZ, Wu SN, Wang HG, et al. The protective effect of betulinic acid (BA) diabetic nephropathy on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Food & function.* 2017;8(1):299-306.
375. Gwon JS, Ju WK, Park SJ, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, et al. The regulatory expression of neuronal nitric oxide synthase in the ischemic rat retina. *Neuroreport.* 2001;12(15):3385-9.
376. Lee EJ, Kim KY, Gu TH, Moon JI, Kim IB, Lee MY, et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in the axotomized ganglion cells of the rat retina. *Brain research.* 2003;986(1-2):174-80.
377. Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, et al. Roles of constitutive nitric oxide synthase in postischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40(2):450-8.
378. Reif DW, McCarthy DJ, Cregan E, Macdonald JE. Discovery and development of neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Free radical biology & medicine.* 2000;28(10):1470-7.
379. Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, et al. Role of peroxynitrite and neuronal nitric oxide synthase in the activation of poly(ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience letters.* 1998;248(1):41-4.
380. Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, Nakazawa H, Shinohara Y. 7-Nitroindazole attenuates nitrotyrosine formation in the early phase of cerebral ischemia-reperfusion in mice. *Neuroscience letters.* 1999;268(2):111-3.
381. Liu XQ, Wu BJ, Pan WH, Zhang XM, Liu JH, Chen MM, et al. Resveratrol mitigates rat retinal ischemic injury: the roles of matrix metalloproteinase-9, inducible

- nitric oxide, and heme oxygenase-1. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2013;29(1):33-40.
382. Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *Journal of pharmacological sciences*. 2013;123(2):79-84.
383. Greco R, Demartini C, Zanaboni AM, Blandini F, Amantea D, Tassorelli C. Endothelial nitric oxide synthase inhibition triggers inflammatory responses in the brain of male rats exposed to ischemia-reperfusion injury. *Journal of neuroscience research*. 2017.
384. Li ST, Pan J, Hua XM, Liu H, Shen S, Liu JF, et al. Endothelial nitric oxide synthase protects neurons against ischemic injury through regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *CNS neuroscience & therapeutics*. 2014;20(2):154-64.
385. Cheon EW, Park CH, Kang SS, Cho GJ, Yoo JM, Song JK, et al. Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol. *Neuroscience letters*. 2002;330(3):265-9.
386. Ji D, Li GY, Osborne NN. Nicotinamide attenuates retinal ischemia and light insults to neurones. *Neurochemistry international*. 2008;52(4-5):786-98.
387. Walter LT, Higa GS, Schmeltzer C, Sousa E, Kinjo ER, Rudiger S, et al. Functional regulation of neuronal nitric oxide synthase expression and activity in the rat retina. *Experimental neurology*. 2014;261:510-7.
388. Song H, Gao D. Fasudil, a Rho-associated protein kinase inhibitor, attenuates retinal ischemia and reperfusion injury in rats. *International journal of molecular medicine*. 2011;28(2):193-8.
389. Portillo JA, Okenka G, Kern TS, Subauste CS. Identification of primary retinal cells and ex vivo detection of proinflammatory molecules using flow cytometry. *Mol Vis*. 2009;15:1383-9.
390. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Tokuda M, Yoshida J. Modification of endothelial NO synthase through protein phosphorylation after forebrain cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 2004;35(11):2582-6.
391. Xing H, Sun S, Mei Y, Herman D. The protective effect of rosuvastatin on ischemic brain injury and its mechanism. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2006;26(6):667-9.

392. Tsai SK, Hung LM, Fu YT, Cheng H, Nien MW, Liu HY, et al. Resveratrol neuroprotective effects during focal cerebral ischemia injury via nitric oxide mechanism in rats. *Journal of vascular surgery*. 2007;46(2):346-53.

Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der elektronischen Fassung entfernt

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen aus der elektronischen Fassung entfernt