

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

Einfluss von Sulodexid auf die Endothelfunktion retinaler Arteriolen im Hyperglykämiemodell

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

Vorgelegt von

Alice Dauth
aus Landstuhl

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung und Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Vaskuläres Endothel.....	3
2.2 Klinische Bedeutung: Diabetes mellitus und diabetische Retinopathie	4
2.3 Entstehung einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion.....	7
2.4 Bedeutung der Substanz Sulodexid	11
2.5 Zusammenfassung zentraler Hypothesen.....	15
3 Material und Methoden	16
3.1 Versuchstiere.....	16
3.2 Verwendete Chemikalien.....	16
3.3 Apparative Ausstattung und verwendete Materialien	18
3.4 Vorbereitung funktioneller Gefäßstudien.....	20
3.4.1 Präparation retinaler Arteriolen.....	20
3.4.2 Integritätsprüfung retinaler Arteriolen	22
3.5 Durchführung funktioneller Gefäßstudien	23
3.5.1 Inkubation retinaler Arteriolen mit hochkonzentrierter Glukoselösung	23
3.5.2 Dosis-Wirkkurven unterschiedlicher Substanzen	24
3.5.3 Prüfen der Wirkung von Sulodexid auf das Endothel retinaler Arteriolen.....	24
3.5.4 Testung unterschiedlicher Sulodexid-Konzentrationen zur Dosisfindung	24
3.6 Nachweis der Genexpression prooxidativer Gene auf mRNA-Ebene	25
3.7 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium-Färbung.....	26
3.8 Nachweis der Genexpression prooxidativer Gene auf Proteinebene.....	27
3.9 Statistische Analyse	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Funktionelle Gefäßstudien retinaler Arteriolen	30
4.2 Dosisfindungsstudien für den Wirkstoff Sulodexid	32
4.3 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	33
4.4 Quantifizierung der NOX-Genexpression auf mRNA-Ebene.....	34
4.5 Quantifizierung der NOX-Genexpression auf Proteinebene.....	36
5 Diskussion	41
5.1 Zusammenfassung zentraler Erkenntnisse	41
5.2 Eigene Ergebnisse im Kontext anderer Studienergebnisse	42
5.2.1 Sulodexid schützt vor einer Hyperglykämie-induzierten Endotheldysfunktion ...	42
5.2.2 Sulodexid reduziert das Auftreten Hyperglykämie-induzierter ROS	45
5.2.3 Dosisfindungsstudien für den Wirkstoff Sulodexid	46
5.2.4 Hyperglykämie führt zu NOX-abhängiger ROS-Produktion.....	48
5.2.5 Einfluss von Sulodexid auf die Expression von NADPH-Oxidasen (NOX).....	51
5.3 Grenzen der Experimente und Forschungsausblick	55

6 Zusammenfassung	56
Literaturverzeichnis	X

Abkürzungsverzeichnis

AGEs	glykierte Reaktionsprodukte (engl. advanced glycation end-products)
DHE	Dihydroethidium
DUOX	Dualoxidase (engl. dual oxidase)
EDHF	endothelabhängiger Hyperpolarisationsfaktor (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDRF	endothelabhängiger Relaxationsfaktor (engl. endothelium-derived relaxing factor)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GPX1	Glutathionperoxidase 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NFκB	engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
NOX	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase)
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. Real Time-PCR)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	Rezeptor für AGEs
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
SNP	Nitroprussid-Natrium-Dihydrat (engl. Sodium natriumprusside)
SOD	Superoxiddismutase

TEER	transendotheliale elektrische Resistenz (engl. transendothelial electrical resistance)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular endothelial growth factor)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Eine anhaltende Hyperglykämie führt über unterschiedliche Signalwege zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen von oxidativem Stress. An der ROS-Entstehung in Endothelzellen sind NADPH-Oxidasen (NOX) maßgeblich beteiligt. Das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) als wichtigster ROS-Vertreter in diesem Zusammenhang reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxinitrit ($ONOO^-$), außerdem kommt es zu einer Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche daraufhin Superoxidanionen generiert. Folglich sinkt die Bioverfügbarkeit des endothelprotektiven Faktors NO. Legende: PKC: Proteinkinase C; AGE: advanced glycation end-products; GMZ: Glatte Muskelzellen.	7
Abbildung 2: Entstehung radikaler und nicht radikaler Sauerstoffverbindungen über Reduktionsmechanismen von molekularem Sauerstoff durch Vier- und Ein- Elektronen Mechanismen, modifiziert nach (22).	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der endothelialen NADPH-Oxidasen am Beispiel der NOX2-Isoform der katalytischen Untereinheit gp91phox und ihrer regulatorischen Untereinheiten. Legende: RAC: Unterform der Rho-Familie der GTPasen; gestrichelte Linie: Zellmembran.	9
Abbildung 4: Strukturformel des Wirkstoffs Sulodexid. Quelle: National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6453528, Sulodexide. Retrieved November 30,2021 from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulodexide#section=2D-Structure	11
Abbildung 5: Bisher publizierte Effekte von Sulodexid. Die Substanz zeigte bereits antithrombotische, antiinflammatorische und endothelprotektive Eigenschaften bei vielfältigen Erkrankungen in unterschiedlichen Spezies und Gefäßbetten.	12
Abbildung 6: B Fotografie eines aufgeschnittenen Schweinebulbus. A Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die retinalen Arteriolen erster Ordnung, welche für die Experimente isoliert wurden.....	20
Abbildung 7: Perfusionskammer, Fotografie. Der Ausschnitt zeigt die Fotografie eines Arteriolensegments. Dieses ist zwischen zwei Mikropillarspitzen aufgespannt und mittels zweier Nylonschlaufen fixiert.....	21
Abbildung 8: Experimentelles Kreislaufsystem. Fassungsvermögen 100 ml aCSF-Pufferlösung.	21
Abbildung 9: KCI-Test zur Integritätsprüfung einer retinalen Arteriole. Videomikroskopische Momentaufnahmen zu zwei Zeitpunkten, Ausmessung mittels Pixellineal.	23
Abbildung 10: Fotografie einer DHE-Färbung in den Gruppen HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid).	27
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Quantifizierung von Leuchtintensitäten mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) am Beispiel einer NOX2-Immunfluoreszenzfärbung eines Kryoschnitts einer mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glukose) inkubierten retinalen Arteriole. A DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe), B Rhodamin Red-X-gekoppelter Sekundärantikörper (rote Farbe), C Umfahren der Gefäßwand (Typ: 16-bit) zur Quantifizierung der Leuchtintensität.....	28
Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Reaktionen retinaler Arteriolen nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid) auf A U46619, B den endothelunabhängigen Vasodilatator SNP und C den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Konzentration und Gruppe; * p < 0,05, HG im Vergleich zu allen anderen Gruppen) angegeben. X-Achse: Konzentration vasoaktiver Pharmaka in (log M), y-Achse: Relative Änderung des Gefäßdurchmessers in % des Ausgangsdurchmessers.	30
Abbildung 13: Gefäßreaktivität retinaler Arteriolen auf den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin nach Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung und	

unterschiedlichen Sulodexidkonzentrationen: 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml. Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung, 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Konzentration und Gruppe; * p < 0,05, HG im Vergleich zu allen anderen Gruppen) angegeben. X-Achse: Konzentration vasoaktiver Pharmaka in (log M), y-Achse: Relative Änderung des Gefäßdurchmessers in % des Ausgangsdurchmessers.....	32
Abbildung 14: DHE-Färbungen retinaler Arteriolen im Querschnitt (Kryoschnitte) nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (NG + 50 µg/ml Sulodexid). Rechte Seite: Fluoreszenzmikroskopische Fotografien der DHE-Färbungen. Linke Seite: Gemessene Leuchtintensitäten normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) angegeben.....	33
Abbildung 15: Boten-RNA-Expression (mRNA) der Gene prooxidativer Redox-Enzyme (A NOX2, B NOX4, C NOX5) nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (NG + 50 µg/ml Sulodexid). Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) angegeben. Die mRNA-Expressionsniveaus sind jeweils normiert auf die Kontrollgruppe NG dargestellt.	35
Abbildung 16: A Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX2 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengefügte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). B Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben.	36
Abbildung 17: A Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX4 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengefügte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). B Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben.	37
Abbildung 18 A Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX5 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengefügte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). B Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben.	39
Abbildung 19: Eine anhaltende Hyperglykämie führt über unterschiedliche Signalwege zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen von oxidativem Stress..	49
Abbildung 20: Mögliche Wirkweise von Sulodexid: Einfluss auf die Regulation prooxidativer Enzyme. Legende: Siehe Abbildung 19.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten aCSF-Pufferlösung.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten High K ⁺ -Krebs-Henseleit-Pufferlösung.....	16
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Chemikalien.....	17
Tabelle 4: Verwendete Primersequenzen für die qPCR-Methode.....	26

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Retina ist ein metabolisch hochaktives Netzwerk aus Nervenzellen, welches für die Verarbeitung visueller Signale und ihre Weiterleitung in unterschiedliche Gehirnareale essenziell ist. Retinale Arteriolen, Aderhautgefäße und Ziliararterien sind für die Perfusion der Retina und des Sehnervenkopfes verantwortlich. Eine Funktionsstörung der versorgenden Netzhautgefäße, insbesondere ihrer Endothelzellschicht, kann zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen der Sehfunktion bis hin zur Erblindung führen. Ein zentrales Beispiel für eine netzhautschädigende Systemerkrankung stellt die diabetische Retinopathie dar, die bei etwa einem Drittel aller Diabetespatienten auftritt und in der westlichen Welt eine der häufigsten Ursachen für Sehbehinderung und Erblindung von Menschen im berufstätigen Alter darstellt (1-3). Gängige Verfahren zur Behandlung der diabetischen Retinopathie sind die Lasertherapie oder die intravitreale Injektion von Antikörperfragmenten gegen den Gefäßwachstumsfaktor VEGF (engl. Vascular endothelial growth factor). Diese können meist eine Erblindung verzögern. Bisher ist jedoch keine Therapie bekannt, welche die Entstehung und Progression der diabetischen Retinopathie zuverlässig vermeidet und Menschen mit Diabetes mellitus vor einer Erblindung schützen kann (1, 4). Aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit und der geringen Größe retinaler Blutgefäße besteht auf diesem Gebiet weiterhin ein hoher Forschungsbedarf, um fundierte Erkenntnisse über die komplexe Pathophysiologie zu erlangen und im Folgenden Therapiestrategien entwickeln zu können. Funktionelle Gefäßstudien stellen eine wichtige experimentelle Methode zur Aufdeckung neuer Therapiemöglichkeiten dar. Hauptziel der hier vorliegenden Dissertation ist die Testung der Hypothese, dass die Substanz Sulodexid vor einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion in retinalen Arteriolen schützt und oxidativen Stress vermindert. Weiterhin sollen im Rahmen dieser Arbeit potenzielle Wirkungsmechanismen von Sulodexid in retinalen Arteriolen identifiziert werden. Der Wirkstoff Sulodexid besteht aus 80 % Heparansulfat (engl. auch „fast-moving heparin“, FMH) und 20 % Dermatansulfat. Durch das im Vergleich zu niedermolekularem Heparin deutlich niedrigere Molekulargewicht ist die Möglichkeit einer oralen Absorption gegeben. Klinisch wird Sulodexid zur Behandlung thromboembolischer Ereignisse und der peripher arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt. Endothelprotektive Effekte wurden bereits in Studien zur diabetischen Nephropathie (5, 6) sowie in humanen retinalen Endothelzellkulturen von Diabetespatienten beobachtet (7). Weiterhin konnte eine aktuelle Studie von Gericke et al. demonstrieren, dass Sulodexid einerseits humane retinale Endothelzellen vor glukoseabhängiger Seneszenz schützen kann andererseits aber auch günstige Effekte auf bereits geschädigte Endothelzellen zeigte (8). Bisher ist jedoch unbekannt, ob Sulodexid eine Diabetes-induzierte endotheliale Dysfunktion verhindern kann und falls ja, welche Mechanismen dahinterstecken.

Die funktionellen Gefäßstudien für die Datenerhebung im Rahmen der Dissertation wurden an isolierten Netzhautarteriolen des Schweins durchgeführt. Hierfür wurde zur Induktion Hyperglykämie-induzierter Endothelschäden ein neues In-vitro-Hyperglykämiemodell etabliert. Getestet wurden die Gruppen: Hochkonzentrierte Glukoselösung (25 mM D-Glukose) +/- Sulodexid 50/5/0,5 µg/ml im Vergleich zu den Kontrollgruppen NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose) +/- Sulodexid. Die Netzhautarteriolen wurden isoliert, kanüliert, in einem experimentellen Kreislaufsystem unter hyperglykämischen Bedingungen (+/- Sulodexid) inkubiert und anschließend das endothelabhängige und endothelunabhängige Vasokonstriktions- und Dilatationsverhalten mittels Videomikroskopie untersucht.

In der Absicht, mögliche Wirkmechanismen von Sulodexid zu klären, wurde der Einfluss von Sulodexid auf prooxidative Redoxenzyme untersucht, welche oxidativen Stress verursachen. Dihydroethidium-Färbungen dienen dem Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies. Mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde die mRNA-Expression prooxidativer Gene (NOX2, NOX4, NOX5) untersucht. Weiterhin dienen spezielle Immunfluoreszenzfärbungen der Untersuchung der Genexpression auf Proteinebene.

2 Literaturdiskussion

2.1 Vaskuläres Endothel

Die Blutversorgung der Retina erfolgt größtenteils über die Zentralarterie (A. centralis retinae), welche aus der Arteria ophthalmica hervorgeht. Nach Eintritt in den Augapfel teilt diese sich zunächst in vier Arteriolen und dann weiter in Kapillaren auf, welche die Netzhautperipherie versorgen. Weitere Netzhautanteile werden via Diffusion über die Chorioidea versorgt. Retinale Arteriolen sind auf ihrer luminalen Seite mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet, deren herausragende Rolle für physiologische Vasoregulationsmechanismen erstmals 1980 von Furchgott und Zawadzki beschrieben wurde (9). Durch Produktion vasoaktiver Substanzen wie Bradykinin, EDHF (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factor), Prostacyclin und Thromboxan A₂ kann die Gewebepерfusion reguliert werden. Am Schweinemodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bradykinin-induzierte Vasodilatation in retinalen Arteriolen hauptsächlich auf der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem retinalen Endothel beruht (10). Nachdem NO 1992 als endothelabhängiger Relaxationsfaktor (engl. endothelium-derived relaxing factor, kurz EDRF) identifiziert wurde (11), konnten vasodilatierende, antiinflammatorische und antiaggregatorische Wirkmechanismen zur Gefäßregulation aufgedeckt werden. Wird das Endothel beispielsweise durch langanhaltende Glukoseexposition und oxidativen Stress beschädigt, kommt es zu einem Nervenzelluntergang und daraus resultierenden Sehstörungen bis hin zur Erblindung. Ein wichtiger Begriff in diesem Zusammenhang ist die Blut-Retina-Schranke, welche aus einer inneren Schicht (Endothelzellschicht) und einer äußeren Schicht (Pigmentepithel) besteht und unter physiologischen Bedingungen eine selektiv permeable Barriere zwischen Retina und Gefäßversorgung darstellt.

2.2 Klinische Bedeutung: Diabetes mellitus und diabetische Retinopathie

Der Diabetes mellitus umfasst eine Gruppe chronischer Stoffwechselerkrankungen, die zu einem dauerhaft erhöhten Blutglukosewert (Hyperglykämie) führen. Zu den bedeutendsten Unterformen zählen Typ-1 und Typ-2. Ersterer führt durch eine autoimmune Zerstörung von Pankreaszellen zu einem absoluten Mangel des blutzuckersenkenden Hormons Insulin. Der Typ-2 Diabetes hingegen ist durch eine Insulinresistenz charakterisiert, welche auf multiple Faktoren wie genetische Veranlagung, arterieller Bluthochdruck, stammbetonte Adipositas, Hypercholesterinämie, Bewegungsmangel und ungesunde Ernährung zurückzuführen ist (12, 13). Laut Schätzungen des Robert Koch-Instituts lag die Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland (2015) bei den 18- bis 79-jährigen Erwachsenen bei 4,6 Millionen Menschen. Dazu kommen etwa 1,3 Millionen Menschen mit einem unerkannten Diabetes mellitus, wobei die Schätzungen aufgrund von Definitionsunterschieden stark variieren (12, 13). Ab einer Nüchternplasmaglukosekonzentration von >7 mmol/l, einem Zweistundenwert von über 11,1 mmol/l im oralen Glukosetoleranztest oder einem Wert des glykierten Hämoglobins (HbA1C) über 47,5 mmol/l wird laut aktueller Versorgungsleitlinie von einem Diabetes mellitus gesprochen. Besonders der Typ-2 Diabetes mellitus verläuft häufig viele Jahre klinisch inapparent, bis er durch eine akute Hypoglykämie, Hyperglykämie (23) oder insbesondere seine zahlreichen und irreversiblen Folgeerkrankungen in Erscheinung tritt. Letztere verursachen einen hohen Leidensdruck der Patienten, umfangreiche Behandlungsbedürftigkeit, eine eingeschränkte Lebenserwartung, Frühberentung und Arbeitsunfähigkeit, sowie hohe Kosten für das Gesundheitssystem (in Deutschland etwa 48 Millionen jährlich) (13). Der erhöhte Blutzuckerspiegel schädigt langfristig die Blutgefäße und peripheren Nerven. Dadurch entsteht eine diabetische Makroangiopathie, welche zu kardiovaskulären Komplikationen wie Herzinfarkten, Schlaganfällen oder arteriellen Verschlusskrankheiten führen kann. Zusätzlich kommt es zu einer diabetischen Mikroangiopathie, welche die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie, die diabetische Neuropathie und das diabetische Fußsyndrom umfasst. Die diabetische Nephropathie stellt die häufigste Ursache für eine dauerhafte Hämodialysetherapie in Deutschland dar (4). Bei Typ-1-Diabetes mellitus besteht die Therapie in einer lebenslänglichen Substitution von Insulin (14). Der Typ-2-Diabetes mellitus kann in frühen Stadien zunächst durch Umstellung von Ernährungs- und Lebensgewohnheiten therapiert werden. Für weitere Therapiestufen stehen orale Antidiabetika, sowie letztlich ebenfalls eine Insulinsubstitution zur Verfügung (15). Bedeutend ist außerdem die regelmäßige Untersuchung der Patienten zur Früherkennung und Kontrolle der genannten Folgeerkrankungen. Akute Entgleisungen des Blutzuckerspiegels können lebensbedrohliche Notfallsituationen hervorrufen. Bei der diabetischen Ketoazidose (bei Typ-1-Diabetikern) werden Spitzenwerte von 400-700 mg/dl (22,2-38,9 mmol/l) erreicht, bei einem hyperosmolaren Koma (bei Typ-2-Diabetikern) Werte von 600-1200 mg/dl (33,3-66,6 mmol/l).

Ein Drittel der 285 Millionen Diabetespatienten weltweit (2010) weist Symptome einer diabetischen Retinopathie auf; sie ist eine der häufigsten Erblindungsursachen von Menschen im berufstätigen Alter weltweit. Zeitdauer des Diabetes mellitus, sowie Ausmaß der Hyperglykämie und Hypertonie, sind die führenden Risikofaktoren für die Entstehung und die Progression der diabetischen Retinopathie. Das diabetische Makulaödem betrifft etwa 7 % der Diabetiker, neben den bereits genannten Risikofaktoren ist zusätzlich eine Dyslipidämie von Bedeutung (1, 4). Die diabetische Retinopathie wird bezüglich ihrer Tendenz zur Gefäßneubildung in eine proliferative und eine nicht-proliferative Form unterteilt. Erstere tritt gehäuft bei Typ-1-Diabetes mellitus auf, letztere bei Typ-2. Die typischen Symptome der nicht-proliferativen Erkrankung sind Mikroaneurysmata, intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA), intraretinale Hämorrhagien, harte Exsudate (retinale Lipidablagerungen), Cotton-wool-Herde (weißliche Netzhautareale, bedingt durch einen Axoplasmastau bei Netzhautischämie), perlschnurartige Kaliberschwankungen der Venen und das Netzhautödem. Gefäßneubildungen sind ein kritisches Zeichen der progredienten Erkrankung, folglich kann es zeitnah zu Glaskörperblutungen oder Fibrose-bedingten Netzhautschädigungen und Netzhautablösungen kommen. Die Bildung fibrovaskulärer Membranen, bei denen Bindegewebe in die neu gebildeten Gefäße einwächst, bergen die Gefahr einer Traktionsamotio. Die gefürchteten Folgen dieser Ereignisse sind die Erblindung und das Sekundärglaukom. Ein erweiterter Gefäßdurchmesser retinaler Arteriolen ist Zeichen einer gestörten Autoregulation und tritt bereits in den Frühphasen der diabetischen Retinopathie auf. Nach dem Gesetz von Laplace wird der Druck bei abnehmendem Radius einer Kugel immer höher. Durch diesen kommt es zu einer dilatierten Gefäßwand (Mikroaneurysmen), erhöhter Gefäßwandpermeabilität (harte Exsudate, Ödeme) und letztlich zu retinalen Hämorrhagien. Die genauen Mechanismen, welche diese Vasodilatation verursachen, sind noch nicht hinreichend verstanden und bedürfen weiterer Forschung (4).

Zu den okulären Therapieformen bei fortgeschrittener proliferativer Erkrankung oder Makulaödem gehört die retinale Laserkoagulation zur Zerstörung ischämischer Netzhautareale. Auch wenn so meist eine Erblindung verzögert werden kann, birgt die Therapieoption vielfältige Risiken, wie irreversible Schädigungen der Retina, Einschränkungen des Nachtsehens und Gesichtsfeldreduktionen. Eine Glaskörperblutung kann durch die chirurgische Vitrektomie verhindert werden, steigert jedoch das Risiko für Iris-Neovaskularisationen und eine Katarakt. Die intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren bei Foveabeteiligung ist eine attraktive Methode, um die diabetische Retinopathie weniger invasiv zu behandeln. Hierfür liegen bisher noch keine ausreichenden Ergebnisse für Langzeiterfolge vor und häufig muss wegen fehlender Zulassungen das Medikament off-label appliziert werden. Negative Folgeerscheinungen können Verletzungen der Retina, Glaskörperblutungen oder Infektionen darstellen. Einige der vorhandenen Wirkstoffe können systemisch wirken und

durch Inhibition der Angiogenese in zahlreichen Körperregionen zu einer Ischämie führen; hiervon sind primär Gehirn, Herz und die Nieren betroffen. Verläuft die Anti-VEGF-Therapie frustriert, ist die intravitreale Injektion von Steroiden geboten (16).

Letztlich ist bisher keine Therapie bekannt, welche die Entstehung und Progression der diabetischen Retinopathie zuverlässig vermeidet und Menschen mit Diabetes mellitus vor einer Erblindung schützen kann (17).

2.3 Entstehung einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion

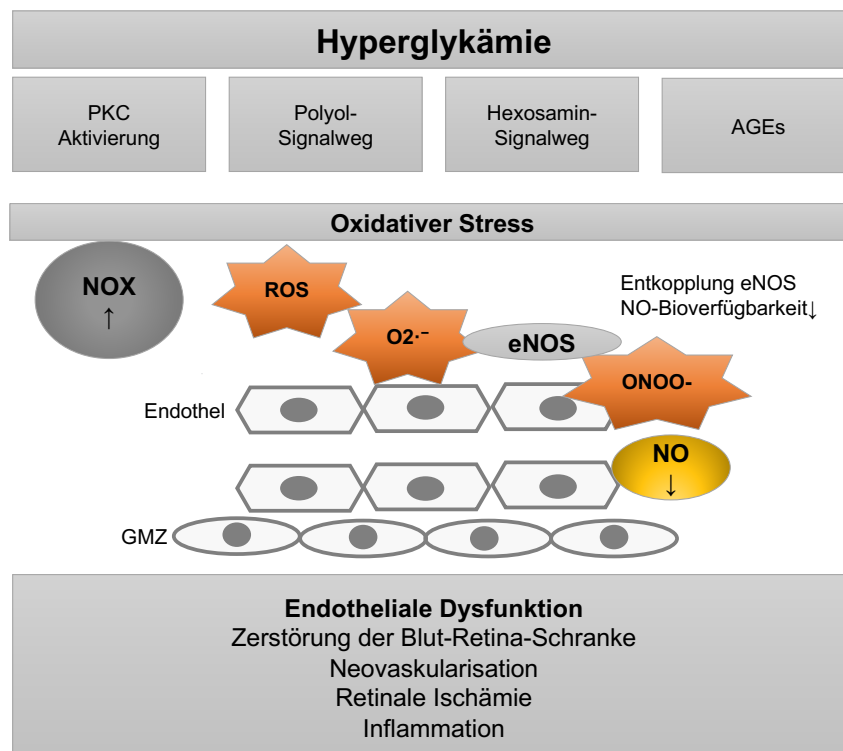


Abbildung 1: Eine anhaltende Hyperglykämie führt über unterschiedliche Signalwege zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen von oxidativem Stress. An der ROS-Entstehung in Endothelzellen sind NADPH-Oxidasen (NOX) maßgeblich beteiligt. Das Superoxidation ($O_2^{\cdot-}$) als wichtigster ROS-Vertreter in diesem Zusammenhang reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO-), außerdem kommt es zu einer Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche daraufhin Superoxidationen generiert. Folglich sinkt die Bioverfügbarkeit des endothelprotektiven Faktors NO. Legende: PKC: Proteinkinase C; AGE: advanced glycation end-products; GMZ: Glatte Muskelzellen.

Nach aktuellem Forschungsstand ist eine anhaltende Hyperglykämie maßgeblich verantwortlich für die Entstehung der diabetischen Retinopathie, dennoch bleiben die genauen Mechanismen weitestgehend unklar (18). Die Entstehung von oxidativem Stress über unterschiedliche Signalwege scheint hierbei ein Schlüsselereignis darzustellen: Die Aktivierung der Proteinkinase C, der Polyol-Signalweg, der Hexosamin Biosynthese-Signalweg und das vermehrte Vorkommen von Glykierungsprodukten (AGEs, engl. advanced glycation end-products) (19). Oxidativer Stress beschreibt ein zelluläres Ungleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Komponenten, welches zu einem Versagen reparativer Mechanismen in der Zelle und folglich einer Gewebeschädigung führen kann (20, 21).

Ein fundamentaler Prozess bei der Entstehung von oxidativem Stress ist die exzessive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS), welche im Folgenden die Induktion von endothelialer Dysfunktion, neuronaler Degeneration, Inflammation und Zelltod herbeiführen. Durch eine Oxidations-Reduktion (Abbildung 2) entstehen unterschiedliche

ROS: Das Superoxid-Anionenradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) oder das Peroxinitrit-Anion (ONOO^-).

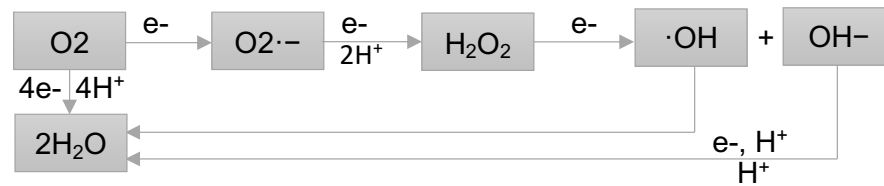


Abbildung 2: Entstehung radikaler und nicht radikaler Sauerstoffverbindungen über Reduktionsmechanismen von molekularem Sauerstoff durch Vier- und Ein-Elektronen Mechanismen, modifiziert nach (22).

Hierbei reagieren freie Elektronen aus dem oxidativen Zellstoffwechsel mit molekularem Sauerstoff zu freien Radikalen. Diese verfügen durch ein unpaares Elektron in ihrer äußeren Orbitalschale über eine hohe Reaktionsfreudigkeit. Neben ROS entstehen auch reaktive Stickstoffspezies (RNS), reaktive Eisenspezies (RIS), sowie reaktive Kupferspezies (RCS). Reaktive Sauerstoffspezies besitzen in physiologischen Konzentrationen relevante Funktionen als sekundäre Botenstoffe für zelluläre Signalwege, welche das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung oder auch die Apoptose betreffen (23). Im Unterschied dazu sind überschüssige ROS Gegenstand aktueller Forschung im Hinblick auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (24), Krebserkrankungen (25), Diabetes mellitus (26) oder auch dem Morbus Alzheimer (27). In vitro wurden bei Hyperglykämie erhöhte Mengen an Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gemessen, die zusammen mit einem erhöhten Wasserstoffperoxidgehalt in Netzhautzellen auftreten (28). Das Superoxidanion ist nach aktuellem Forschungsstand maßgeblich für eine Endotheldysfunktion verantwortlich, indem es eine verminderte Bioverfügbarkeit des endothelprotektiven Faktors NO hervorruft, wodurch protektive Mechanismen von Endothelzellen inhibiert und so inflammatorische und zellschädigende Prozesse verstärkt werden (29, 30). Durch die direkte Reaktion des Superoxidanions mit NO entsteht Peroxinitrit, das die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) induziert. Das Enzym produziert daraufhin anstatt NO vermehrt Superoxidanionen (19). Wasserstoffperoxid passiert über Diffusion die Zellmembran und dient in niedrigen Konzentrationen der Regulation physiologischer Prozesse (31). In hohen Konzentrationen hingegen werden oxidativer Stress (31), inflammatorische Prozesse (32) und Zelltod (31) initiiert. Eine retinale endotheliale Dysfunktion durch hohe ROS-Level zeigt sich in einer verminderten Reaktion von Endothelzellen auf physiologische Stimuli wie Scherstress und vasoaktive Substanzen (33), sowie ein prokoagulatorisches Milieu (34). ROS werden bei Eukaryonten unter physiologischen Bedingungen zu über 90 % in den Mitochondrien produziert (35). Zusätzlich entstehen ROS im endoplasmatischen Retikulum vorwiegend über Enzyme der Cytochrom-P450-Familie, sowie durch unterschiedliche Oxidasen.

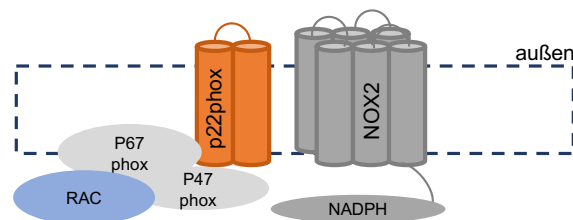


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus der endothelialen NADPH-Oxidasen am Beispiel der NOX2-Isoform der katalytischen Untereinheit gp91phox und ihrer regulatorischen Untereinheiten. Legende: RAC: Unterform der Rho-Familie der GTPasen; gestrichelte Linie: Zellmembran.

Der Nikotinamin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase-Komplex (NADPH-Oxidase, NOX) stellt einen membrangebundenen Enzymkomplex dar, dessen katalytische Untereinheit sieben Isoformen umfasst: NOX1-5, sowie DUOX1-2 (Dualoxidase, engl. dual oxidase). Die Vertreter NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 werden in humanen Endothelzellen exprimiert (30) und kommen im endoplasmatischen Retikulum, sowie teilweise zytoplasmatisch und in der Kernmembran vor (30). Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der endothelialen NADPH-Oxidasen am Beispiel der Isoform NOX2; neben der katalytischen Untereinheit sind mehrere regulatorische Untereinheiten Teil des Enzymkomplexes (p67phox, p47phox, sowie regulatorische G-Proteine). NOX1, NOX2 und NOX5 generieren durch den Elektronentransfer von NADPH auf Sauerstoff Superoxidanionen, wohingegen durch die NOX4 Wasserstoffperoxid entsteht. Dabei ist hervorzuheben, dass die Isoformen NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 bereits mit der Pathogenese der diabetischen Retinopathie assoziiert wurden (36). Durch eine erhöhte NOX-Expression werden vermehrt ROS produziert, welche unter anderem eine erhöhte Permeabilität der Blut-Retina-Schranke, inflammatorische Prozesse (37), sowie eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit (durch Entkopplung der eNOS) begünstigen (33). Darüber hinaus trägt die Induktion der Proteinkinase C entscheidend zur NOX-Induktion bei; dieser Signalweg veranlasst zusätzlich die Bildung inflammatorischer Marker (wie NFκB, engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), sowie die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren (wie VEGF), welche für pathologische Neovaskularisationsprozesse entscheidend sind.

Die Eliminierung der ROS geschieht über Antioxidantien. Diese werden zum Teil mit der Ernährung aufgenommen (Vitamine, Mineralien), zum Teil vom Organismus synthetisiert. Das Tripeptid Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) ist von herausragender antioxidativer Bedeutung; es kann ROS direkt eliminieren oder als Kofaktor von antioxidativen Enzymen dienen (38). Beispielsweise katalysiert das Enzym Glutathionperoxidase-1 die Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei gleichzeitiger Oxidation von Glutathion. Durch die Isoformen des Enzyms Superoxiddismutase 1-3 (SOD1-3) entsteht aus dem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches über das Enzym Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff reagiert (22).

Unter Hyperglykämie-induzierten oxidativen Stressbedingungen kommt es außerdem zu einer Überaktivierung des Polyol-Signalwegs. Dieser resultiert in einer Akkumulation von ROS durch verminderte Regeneration des Antioxidans Glutathion. Zusätzlich kommt es durch eine Anhäufung von Sorbitol und Fruktose zur Veränderung des osmotischen Drucks, wodurch es zur Ödembildung und einem Anstieg der Gefäßpermeabilität kommen kann (39). Interessanterweise wurde eine vermehrte Expression der Aldosereduktase (Leitenzym des Polyol-Signalwegs) bereits in apoptotischen Endothel- und Pigmentepithelzellen der Retina festgestellt (40). Infolgedessen werden zentrale pathophysiologische Effekte der diabetischen Retinopathie begünstigt, wie beispielsweise die Zerstörung der Blut-Retina-Schranke und eine vermehrte Leukozytenadhäsion, die inflammatorische Signalwege in Gang setzt.

Weiterhin kann das Peptidhormon Angiotensin II eine oxidative Netzhautschädigung induzieren, die mit Vasokonstriktion, Entzündung, oxidativem Stress, zellulärer Dysfunktion und pathologischer Angiogenese einhergeht. Das Enzym ist im Rahmen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) an der Blutdruckregulierung beteiligt (41). Es spielt sowohl bei Diabetes mellitus als auch der Atherosklerose eine entscheidende Rolle (42). Ein lokales RAAS wurde ebenfalls im Auge beschrieben (43). Es wird vermutet, dass dieses durch Hyperglykämie aktiviert wird und im Folgenden zu endothelialer Dysfunktion und Neurodegeneration beiträgt (43).

Mehrere unabhängige Signalwege resultieren bei Diabetikern in der chronischen Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Hierbei scheinen AGEs im Sinne der Bildung eines hyperglykämischen Gedächtnisses von zentraler Bedeutung zu sein (44). AGEs sind eine heterogene Gruppe von Verbindungen, die durch eine nicht enzymatische Glykierungsreaktion entstehen und maßgeblich an Diabetes mellitus-assoziierten Komplikationen beteiligt sind. Aktuelle Forschungsarbeiten haben die Rolle von AGEs bei Alterungsprozessen, Atherosklerose und der Alzheimer-Krankheit aufgezeigt (45, 46). AGEs üben ihre Wirkungen über die Interaktion mit Rezeptoren, wie beispielsweise dem RAGE (Rezeptor für AGEs), aus. Zu diesen gehören die ROS-Induktion, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie proapoptotischer und proangiogener Faktoren, die letztlich zu einer schweren Beeinträchtigung des Endothels und einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit durch Entkopplung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) führen (47).

Zusammenfassend ist die vermehrte Entstehung von ROS bei Hyperglykämie-assoziiertem oxidativem Stress ein fundamentaler Prozess bei der Induktion von endothelialer Dysfunktion, Neurodegeneration und Inflammation im retinalen Gewebe und könnte somit einen Ansatzpunkt in der Therapie und Prävention der diabetischen Retinopathie darstellen.

2.4 Bedeutung der Substanz Sulodexid

Der Wirkstoff Sulodexid ($C_{12}H_{17}N_5O_4$; N(6), O(2)-Dimethyladenosin) ist ein Glykosaminoglykan, bestehend aus 80 % Heparansulfat und 20 % Dermatansulfat (48, 49). Er wird aus intestinalen Mukosazellen des Schweins gewonnen (50).

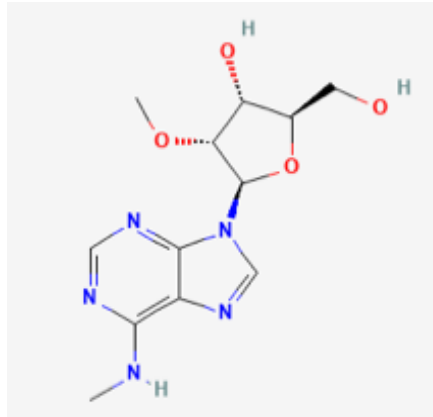


Abbildung 4: Strukturformel des Wirkstoffs Sulodexid. Quelle: National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 6453528, Sulodexide. Retrieved November 30, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulodexide#section=2D-Structure>

Glykosaminoglykane bestehen aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die aus nicht-sulfatierten oder sulfatierten Monosacchariden aufgebaut sind. Sie kommen in allen Säugetieren vor und haben einen bedeutenden Einfluss auf die Eigenschaften von Zellen, der über eine direkte Rezeptorwirkung oder über Wachstumsfaktoren vermittelt wird (49). Die Heparansulfatkomponente von Sulodexid besteht vorwiegend aus Glucuronsäure und Glucosamin. Im Vergleich zu niedermolekularem Heparin beträgt das Molekulargewicht von Heparansulfat nur etwa die Hälfte (7000 Dalton) (50). Darüber hinaus ist die Halbwertszeit (11-12 Stunden bei intravenöser Gabe) deutlich verlängert und die Möglichkeit der oralen Absorption gegeben (51). Interessanterweise wurden für Sulodexid geringere Effekte auf globale Blutgerinnungstest, sowie ein vermindertes Auftreten von Blutungskomplikationen beobachtet (51). Der Bestandteil Dermatansulfat besteht aus den Komponenten Iduronsäure und Galactosamin und verfügt über ein Molekulargewicht von etwa 25.000 Dalton. Dermatansulfat kommt in der Haut, in Herzklappen und Gefäßwänden vor (49).

Klinisch wurde Sulodexid 1982 erstmalig zur Behandlung vaskulärer Erkrankungen mit Thromboserisiko durch Alfa Wassermann S.p.A. auf den Markt gebracht (5). Mögliche Applikationsformen sind intravenös, intramuskulär oder oral. Die Metabolisierung von Sulodexid erfolgt in der Leber, während die Exkretion über die Nieren stattfindet (49). Der Wirkstoff gilt laut Studien als nebenwirkungsarm. Seltene Nebenwirkungen umfassen Diarrhö, Dyspepsie, Sodbrennen oder Schwindel. Heute wird Sulodexid in Teilen Osteuropas, Asiens und Südafrikas zur Behandlung der peripher arteriellen Verschlusskrankheit, thromboembolischer Ereignisse, chronisch venöser Insuffizienz (50) und diabetischer

Nephropathie (5) eingesetzt. Bei der diabetischen Nephropathie konnte eine verminderte Albuminurie durch Sulodexidgabe festgestellt werden, was auf endothelschützende Eigenschaften der Substanz hindeutet (5, 6). Tierstudien zeigten eine protektive Wirkung von Sulodexid bei der kardialen Reperfusion von ischämischem Kaninchenmyokard, ohne das Blutungsrisiko zu erhöhen (52). In einem Ischämie-Reperfusionsmodell an Rattennieren konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (53). Darüber hinaus zeigte eine Metaanalyse, dass Sulodexid das Rezidivrisiko bei Patienten mit peripherer Venenthrombose signifikant senken konnte (54). Der Wirkstoff ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung zur Sekundärprophylaxe bei Patienten mit Zustand nach Lungenembolien und im Rahmen diabetischer Folgeerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Retinopathie. In Abbildung 5 werden die bisher beschriebenen Wirkungen von Sulodexid, von denen einige im Folgenden näher erläutert werden, dargestellt.

Sulodexid		
antithrombotisch	antiinflammatorisch	endothelprotektiv
↑ Gewebspasminogen-Aktivator Katalyse von Antithrombin III + Heparin Kofaktor II ↓ Plasminogen-Aktivator-Inhibitor	↓ ROS ↓ Leukozytenaktivierung + Adhäsion Zytokin- und Chemokinfreisetzung: ↓ Interleukin 6 ↓ Chemoattractant Protein 1	↓ ROS ↑ Glykocalixregeneration Regulation Gefäßtonus

Abbildung 5: Bisher publizierte Effekte von Sulodexid. Die Substanz zeigte bereits antithrombotische, antiinflammatorische und endothelprotektive Eigenschaften bei vielfältigen Erkrankungen in unterschiedlichen Spezies und Gefäßbetten.

In den Forschungsarbeiten der letzten Jahre wurden antithrombotische, endothelprotektive und antiinflammatorische Effekte der Substanz Sulodexid beschrieben (Abbildung 5). Die antithrombotische Wirkung ist bisher am besten verstanden, sie verläuft über zwei unterschiedliche Signalwege, die eine synergistische Wirkung aufweisen. Die Bildung von Thrombin, welches in der Gerinnungskaskade eine essenzielle Rolle spielt, wird zum einen durch Heparansulfat über Interaktion mit Antithrombin III gehemmt, zum anderen durch Dermatansulfat über den Heparin Kofaktor II (55). Außerdem steigert Sulodexid die Konzentration des Gewebspasminogen-Aktivator (engl. tissue plasminogen activator, tPA), einem Aktivator der Fibrinolyse (56). Möglicherweise hemmt Sulodexid ebenfalls die Thrombozytenaggregation, sowie den Gerinnungsfaktor Xa (57). Somit eignet sich Sulodexid

zur Prävention thrombotischer Komplikationen bei arteriellen und venösen Gefäßerkrankungen (58) bei gleichzeitig geringem Risiko von Blutungskomplikationen (51).

Eine herausragende Besonderheit des Wirkstoffs ist die ausgeprägte Absorption durch das vaskuläre Endothel (49). Die genauen Mechanismen der endothelprotektiven und antiinflammatorischen Wirkweise von Sulodexid sind weitestgehend ungeklärt. Die bereits veröffentlichten Arbeiten zu diesem Thema beschäftigten sich mit zahlreichen unterschiedlichen Gefäßbetten, Spezies und Pathologien. Weiterhin ist hervorzuheben, dass die beschriebenen Wirkungsweisen häufig aus den bekannten Effekten der Einzelbestandteile Heparansulfat und Dermatansulfat abgeleitet werden und sich nicht spezifisch auf Sulodexid beziehen. In aktuellen Studien wurden günstige Effekte der Substanz Sulodexid auf die Regeneration der Glykokalix, die als luminale Schutzschicht des Endothels eine entscheidende Bedeutung für die vaskuläre Integrität spielt, beschrieben (59). Dabei wird eine vermehrte Bereitstellung von Glykosaminoglykanen als essenzielle Glykokalixbestandteile durch Sulodexid vermutet (7). Eine Verminderung des Glykokalixvolumens wurde sowohl bei Typ-1-Diabetikern als auch bei gesunden Patienten unter hyperglykämischen Bedingungen gemessen (2, 7), woraus Blutungskomplikationen und eine vermehrte Gefäßpermeabilität resultieren können. Broekhuizen et al. beobachteten unter Sulodexidgabe eine signifikante Erhöhung der Glykokalixdicke in sublingualen und retinalen Gefäßen (7). Weiterhin zeigten Gericke et al. eine Zunahme der durch Hyperglykämie-verringerten transendothelialen elektrischen Resistenz (TEER, engl. transendothelial electrical resistance) als Zeichen einer verbesserten Zellmembranintegrität (8).

Von großer Bedeutung ist die Modulation inflammatorischer Mediatoren, darunter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten und Makrophagen vermitteln und so Entzündungsreaktionen und endothelschädigende Prozesse begünstigen (60). Hemmende Effekte von Sulodexid auf das Zytokin Interleukin 6 und das Chemokin Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) konnten bereits an humanen umbilikalen Endothelzellen (61) und humanen retinalen Endothelzellen beobachtet werden (8). MCP-1 scheint eine bedeutende Rolle in bei der Induktion inflammatorischer Signalwege im Zusammenhang mit einer Hyperglykämie-assoziierten Atheroskleroseentstehung zuzukommen (62).

Die exzessive Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist maßgeblich für eine oxidative Endothelschädigung verantwortlich. ROS verstärken inflammatorische Prozesse und vermindern die NO-Bioverfügbarkeit. Ciszewicz et al. beschrieben eine verminderte Radikalbildung in venösen umbilikalen Endothelzellen nach Sulodexidgabe, der dafür verantwortliche Mechanismus bleibt jedoch bisher unklar (28, 63).

Die genaue Wirkungsweise von Sulodexid ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Dissertation sollen mögliche Wirkmechanismen diskutiert werden, durch welche Sulodexid die Endothelfunktion retinaler Arteriolen im Diabetesmodell verbessern und oxidativen Stress vermindern kann.

2.5 Zusammenfassung zentraler Hypothesen

1. Hochkonzentrierte Glukoselösung (25 mM D-Glukose) induziert im In-vitro-Schweinemodell bereits nach einer zweistündigen Inkubation eine endotheliale Dysfunktion retinaler Arteriolen.
2. Dabei kommt es zur vermehrten Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen von Hyperglykämie-assoziiertem oxidativem Stress.
3. Die gleichzeitige Inkubation mit dem Wirkstoff Sulodexid schützt retinale Arteriolen vor einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion und reduziert oxidativen Stress.
4. Die Substanz Sulodexid hat einen Einfluss auf die Expression prooxidativer Gene auf mRNA- und Proteinebene.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Im Rahmen der Arbeit wurden keine Studien an lebenden Tieren, sondern ausschließlich In-vitro-Versuche durchgeführt. Die Bulbi stammen aus kastrierten männlichen und weiblichen Schweinen der Gattung Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) eines regionalen Bauernhofs. Die Tiere waren zwischen sechs und sieben Monaten alt und durchschnittlich 125 kg schwer. Die Haltung erfolgte im Außenklimastall auf Stroh. Direkt nach Tötung der Tiere durch Elektroschock wurden die Bulbi entnommen und in gekühlter aCSF-Pufferlösung transportiert.

3.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten aCSF-Pufferlösung.

Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)-Pufferlösung			
Name	Summenformel	CAS-Nr.	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	125,00 mM
Kaliumchlorid	KCl	7447-40-7	2,50 mM
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	7786-30-3	1,01 mM
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	10049-21-5	1,63 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	144-55-8	25,00 mM
Kalziumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10035-04-8	2,50 mM
α-D(+)-Glukose Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	14431-43-7	5,00 mM

Alle Chemikalien der aCSF-Lösung: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten High K⁺-Krebs-Henseleit-Pufferlösung.

High K ⁺ -Krebs-Henseleit-Pufferlösung			
Name	Summenformel	CAS-Nr.	Konzentration
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	17,00 mM
Kaliumchlorid	KCl	7447-40-7	100,00 mM
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ x H ₂ O	14168-73-1	1,20 mM
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	7778-77-0	1,20 mM
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	144-55-8	25,00 mM
Kalziumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10035-04-8	2,50 mM
α-D(+)-Glukose Monohydrat	C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	14431-43-7	11,00 mM

Alle Chemikalien der aCSF-Lösung: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Chemikalien.

Auflistung verwendeter Chemikalien			
Name	CAS-Nr.	Produkt-Nr.	Hersteller
Carbogen-Gas	8063-77-2		Linde AG, München, DE
Nitroprussid-Natrium-Dihydrat	13755-38-9		Merck KGaA, Darmstadt, DE
U46619 (9,11-dideoxy-9 α ,11 α - methanoepoxy prostaglandin F2)	56985-40-1		Cayman Chemical Company, Michigan, USA
Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Low Glucose (5,5 mM), [+] 1 g/l D-Glucose, [+] L-Glutamine, [+] 110 mg/l Sodium Pyruvate		11885-084	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose (25 mM), [+] 4,5 g/l D-Glucose, [+] L-Glutamine, [-] Sodium Pyruvate		11965-092	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Advanced Glycation End Product-Bovine Serum Albumin (AGE-BSA)		22968-10	Cayman Chemical Company, Michigan USA
Vessel Due F (Sulodexid) 300 LSU/ml	57821-29-1		Alfa Wassermann S.p.A, Bologna, ITA
Tissue-Tek O.C.T Compound		12351753	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, NL
Dulbecco's phosphate buffered saline, [-] CaCl ₂ und [-] MgCl ₂		14190136	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dihydroethidium (DHE) (C ₂₁ H ₂₁ N ₃)	38483-26-0	D11347	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) ROTIDRY®Sept \geq 99,8 % (\leq 100 ppm H ₂ O)	67-68-5	5179.1	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, DE

Triton X-100	9002-93-1		Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, DE
BSA (Bovine Serum Albumin)	9048-46-8		Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, DE
PFA 4 % (Paraformaldehyd)	9002-93-1		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	28718-90-3		BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, DE
VEGF-A primary antibody, polyclonal, rabbit (Vascular endothelial growth factor A)		ab9570	Abcam, Waltham, MA, USA
NOX1;2;4;5 primary antibody, polyclonal, rabbit (Nikotinamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase)		ab131088 ab80508 ab154244 ab191010	Abcam, Waltham, MA, USA
Rhodamin Red-X-coupled, goat- anti Rabbit polyclonal secondary antibody		111-295- 003	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Bradykinin	23815-91-0		Sigma-Aldrich [®] , Steinheim, DE

3.3 Apparative Ausstattung und verwendete Materialien

Stereomikroskop Olympus SZ61 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, JPN)

Invertiertes Lichtmikroskop SXB-1A (Lowest Price Microscopes, Missouri, USA)

Laptop Mac Book Air 2014 (Apple, Cupertino, USA)

Mikropinzetten 4/5 (Dumont, Montignez, CHE)

Mikroschere (Geuder, Heidelberg, DE)

Peristaltikpumpe Cyclo II (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE)

Perfusionskammer, Spezialanfertigung (Jim's Instruments MFG. INC., Iowa City, USA)

Vertical Pipette Puller (David Knopf Instruments, Kalifornien, USA)

Wärmequelle (Haake, Karlsruhe, DE)

Mikrotom (Leica Reichert Jung, 2030, Leica, Rijswijk, NL)

Brutschrank VWR INCU-Line (VWR International, Radnor, USA)

Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS 100 (Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN)

Digitale Mikroskopkamera DS-Fi1-U2 (Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN)

ELWD 20x /0,45 S Plan Fluor Ph1 Objektiv (Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN)

Mikro-Glaskapillaren (Drummond Scientific Company, Broomall, USA)

Ophthalmochirurgisches monofiles Nahtmaterial Größe 10/0, 11/0 (Nylon Black Monofilament; Alcon, Freiburg, DE)

Transferpipetten (Sarstedt, Nümbrecht, DE)

Kryomolds (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, NL)

Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE)

Objektträger SuperFrost Plus™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Menzel Deckgläser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Tuberkulin-Spritzen (B. Braun, Melsungen, DE)

Zentrifugenröhrchen 50 ml Falcon™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

CyberLink Power Director Software Version v7 (Cyberlink Corporation, Taipei, TWN)

Free Ruler Software, Version 1.7. (Freeware, Pascal Balthrop Software, DE)

GraphPad PRISM Software, Version 9 (GraphPad Inc., San Diego, USA)

NIS Elements Software, Version 1.10 64 bit (Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN)

Bildverarbeitungsprogramm ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

E.Z.N.A. total RNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, USA)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA).

iCycler iQ System (Bio-Rad Laboratories, München, DE)

Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix Kit (Thermo Fischer Scientific, Surrey, UK)

3.4 Vorbereitung funktioneller Gefäßstudien

3.4.1 Präparation retinaler Arteriolen

Nach dem Transport wurden die Bulbi mit einem Skalpell am Limbus eröffnet und der Glaskörper mit Mikropinzetten entfernt. Durch eine subretinale Injektion von aCSF-Pufferlösung löste sich die Retina vom Pigmentepithel ab und konnte anschließend an der Pars plana exzidiert werden. Mittels einer Mikroschere wurden Arteriolen erster Ordnung aus der Retina isoliert und mittels Mikropinzetten von Retinagewebe befreit.

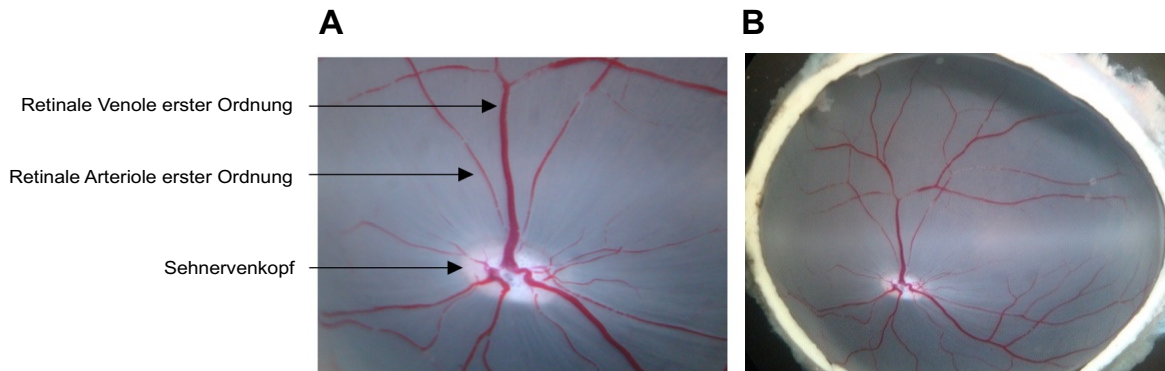


Abbildung 6: **B** Fotografie eines aufgeschnittenen Schweinebulbus. **A** Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die retinalen Arteriolen erster Ordnung, welche für die Experimente isoliert wurden.

Nach der Präparation wurde ein Netzhautarteriolensegment von ca. zwei Millimetern Länge in eine Perfusionskammer (Jim's Instrument Manufacture Inc., Iowa City, USA) transferiert. Diese bestand aus einem Becken, welches mit ca. 20 ml kalter aCSF-Pufferlösung befüllt wurde und zwei Silikonschläuchen, die als Halterung für je eine Mikrokapillarspitze (Drummond Scientific Company, Broomall, USA), sowie der intraluminalen Druckregulation dienten. Zwischen den Kapillarspitzen wurden die Gefäße aufgespannt und mittels zuvor selbstgeknüpfter Schlaufen aus ophthalmochirurgischem Nahtmaterial (10.0 Nylon Black Monofilament Alcon, Freiburg, DE) befestigt.

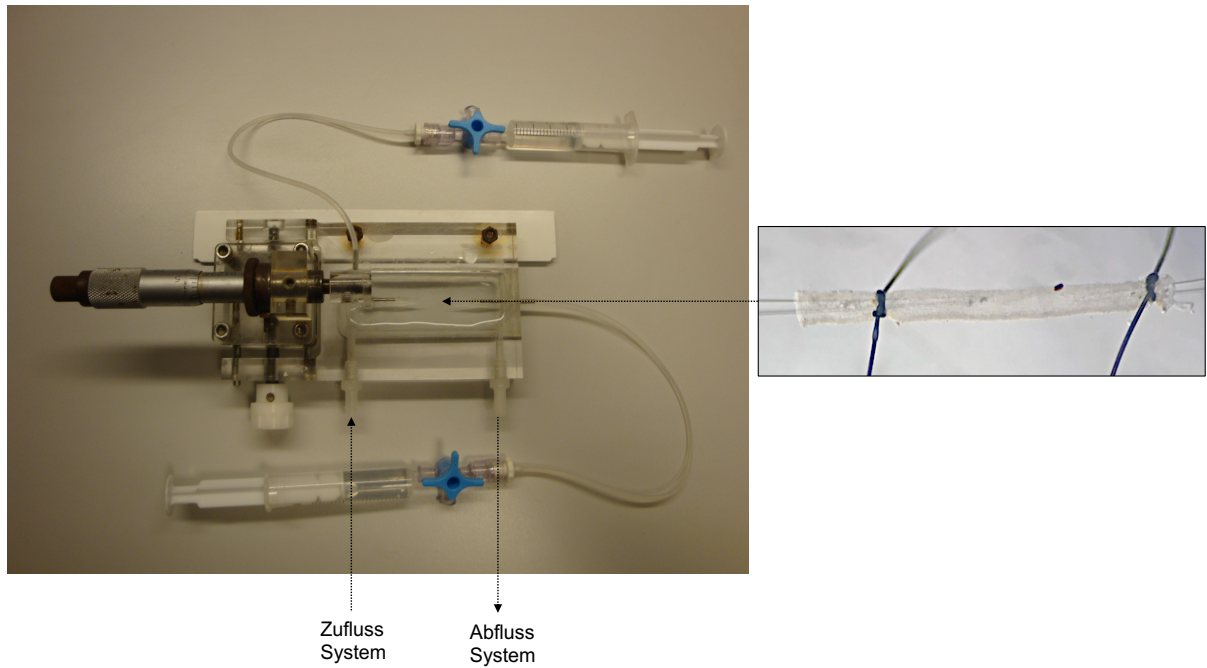


Abbildung 7: Perfusionkammer, Fotografie. Der Ausschnitt zeigt die Fotografie eines Arteriolensegments. Dieses ist zwischen zwei Mikrokapillarspitzen aufgespannt und mittels zweier Nylonschlaufen fixiert.

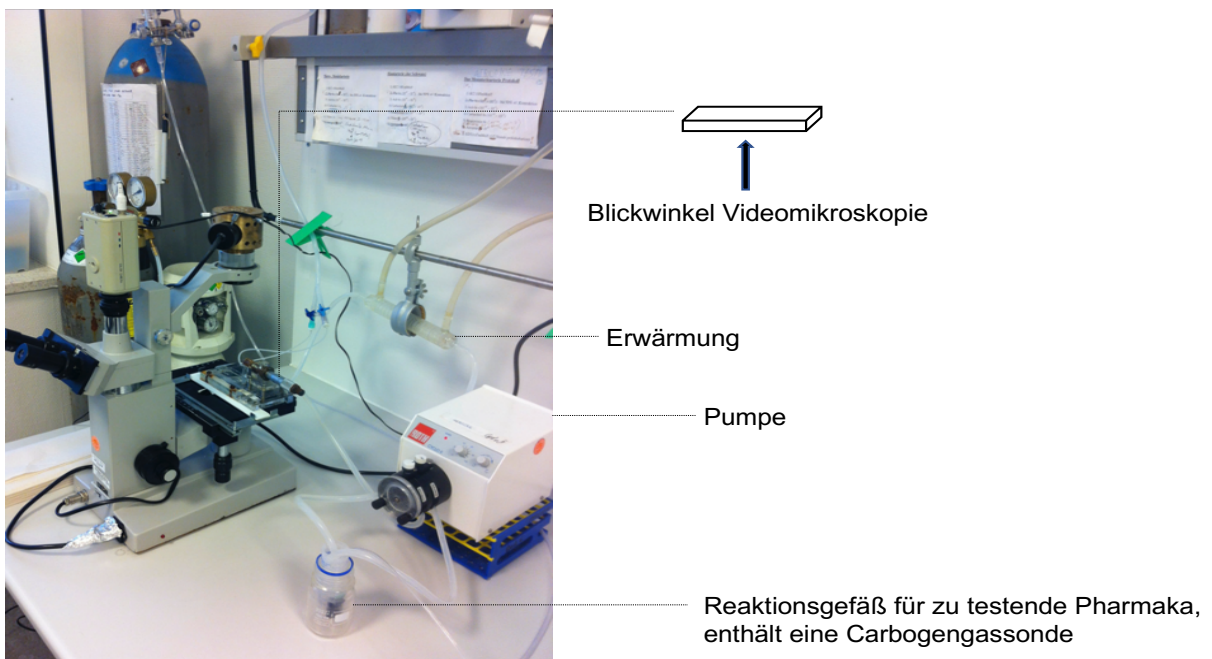


Abbildung 8: Experimentelles Kreislaufsystem. Fassungsvermögen 100 ml aCSF-Pufferlösung.

Die Perfusionskammer mit dem kanülierten Blutgefäß wurde in das oben dargestellte experimentelle Kreislaufsystem eingebracht, eine angeschlossene Peristaltikpumpe (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) ermöglichte die Zirkulation von aCSF-Pufferlösung. Diese wurde von einem an ein Wasserbad angeschlossenen Durchlauferhitzer auf 37 °C erwärmt (Wärmequelle; Haake, Karlsruhe, DE). Über eine Elektrode im Messgefäß wurde eine ständige Begasung mit Carbogen-Gas sichergestellt. So konnten die kontinuierliche Sauerstoffversorgung des Gefäßes und konstante Temperatur- und pH-Bedingungen gewährleistet werden. Die Glaskapillaren in der Perfusionskammer wurden an eine hydrostatische Drucksäule von 40 mmHg (64) angeschlossen, welche laut Studien den physiologischen Verhältnissen in retinalen Arterien sehr nahe kommt (64). Der pH-Wert konnte so konstant bei 7,4 gehalten werden. In das Reaktionsgefäß wurden für die Dosis-Wirkkurven Pharmaka unterschiedlicher Konzentrationen eingegeben und anschließend durch das Umwandeln des geschlossenen in einen offenen Kreislauf wieder entfernt. Über den lichtdurchlässigen Boden der Perfusionskammer gelang das ständige Beobachten der Änderungen des luminalen Endotheldurchmessers des Blutgefäßes über ein invertiertes Lichtmikroskop SXB-1A (Lowest Price Microscopes, Missouri, USA). Ein angeschlossener Laptop (Mac Book Air 2014, Apple, Cupertino, USA) ermöglichte das Aufzeichnen von Videos zur späteren Auswertung der Messungen über das Softwareprogramm CyberLink Power Director (Version 7, Cyberlink Corporation, Taipei, TWN). Die Analyse der Videos gelang durch ein virtuelles Pixellineal (Free Ruler Version 1.7., Freeware, Pascal Balthrop Software, DE), durch welches der Gefäßdurchmesser gemessen und in % des Ausgangsdurchmessers angegeben werden konnte.

3.4.2 Integritätsprüfung retinaler Arteriolen

Zur Überprüfung der Vitalität des zu messenden Blutgefäßes wurde nach kurzer Äquilibration im experimentellen Kreislaufsystem der Ausgangsdurchmesser wie beschrieben bestimmt und anschließend 100 ml High K⁺-Lösung in den Kreislauf eingespült. Diese Konzentration bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran mit anschließendem Kalziumeinstrom in die glatten Gefäßmuskelzellen, welche durch eine Vasokonstriktion messbar wird. Eine Konstriktion von über 30-50 % wurde als Integritätsbeweis festgelegt (65) und das Gefäß somit für weitere Messungen in die Studie einbezogen.

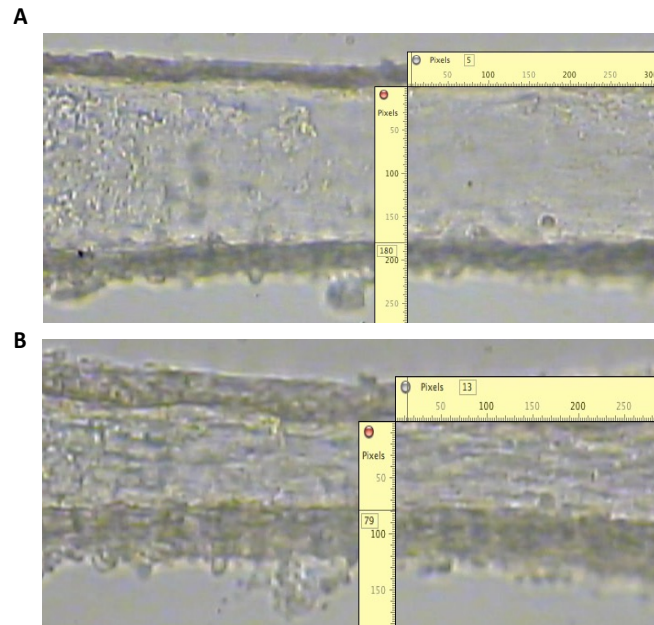


Abbildung 9: KCI-Test zur Integritätsprüfung einer retinalen Arteriolen. Videomikroskopische Momentaufnahmen zu zwei Zeitpunkten, Ausmessung mittels Pixellineale.

3.5 Durchführung funktioneller Gefäßstudien

3.5.1 Inkubation retinaler Arteriolen mit hochkonzentrierter Glukoselösung (25 mM D-Glukose)

Bereits vor dem Kanülieren der präparierten Netzhautarteriolen wurden die zu den Glaskapillaren führenden Schläuche der Perfusionskammer mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG, DMEM-High Glucose, 25 mM D-Glukose, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgespült. Anschließend erfolgte das Kanülieren und der Versuchsaufbau wie oben dargestellt. Die hydrostatische Drucksäule wurde ebenfalls mit hochkonzentrierter Glukoselösung befüllt, um zu gewährleisten, dass im Lumen des Gefäßes dauerhaft eine erhöhte Glukosekonzentration vorherrscht. Nach der Integritätsprüfung erfolgte eine zweistündige Inkubation mit HG unter ständiger Zirkulation von Pufferlösung. Anschließend wurde die Funktion des luminalen Endothels mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven gegenüber unterschiedlichen gefäßaktiven Substanzen bestimmt. Die Kontrollgruppe wurde für zwei Stunden mit normalkonzentrierter Glukoselösung (NG, DMEM-Low Glucose, 5,5 mM D-Glukose, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert.

3.5.2 Dosis-Wirkkurven unterschiedlicher Substanzen

Zunächst wurde das Thromboxanalagon U46619 (9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy prostaglandin F₂ α ; Cayman Chemical Company, Michigan, USA) in zweiminütigen Abständen in steigender Konzentration (10⁻¹¹-10⁻⁶ mol/l) zugegeben. Die maximale Änderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert wurde vor Zugabe der nächsthöheren Konzentration gemessen und notiert. U46619 ist ein Thromboxan-A₂-Mimetikum und Agonist am Thromboxan-A₂-Rezeptor, welcher an glatten Gefäßmuskelzellen je nach Gefäßgebiet eine mehr oder weniger starke Kontraktion hervorruft.

Für die zweite Dosis-Wirkkurve diente als Ausgangspunkt eine Vorkontraktion des Gefäßdurchmessers auf 50-70 %, des Ausgangswertes durch U46619 (66). Konnte dieser Wert erzielt werden, wurden die Arteriolen für weitere Experimente verwendet. Daraufhin wurde der endothelabhängige Vasodilatator Bradykinin (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, DE) in aufsteigenden Konzentrationen (10⁻¹² - 10⁻⁷ mol/l) und dreiminütigen Abständen hinzugegeben. Die endothelabhängige Vasodilatation retinaler Arteriolen des Schweins kann laut Literatur am besten durch Bradykinin induziert werden (67, 68). Die Änderung des Endotheldurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert wurde vor Zugabe der nächsthöheren Konzentration gemessen und notiert. Anschließend erfolgte das Auswaschen der Substanz mit 200 ml aCSF-Pufferlösung und eine erneute Vorkontraktion. Daraufhin wurde der endothelunabhängige Vasodilatator Nitroprussid-Natrium-Dihydrat (SNP; Merck KgaA, Darmstadt, DE) in aufsteigenden Konzentrationen (10⁻⁹ - 10⁻⁴ mol/l) und zweiminütigen Abständen hinzugegeben. Die Messungen erfolgten analog. SNP fungiert als NO-Donor und inhibiert über eine Signalkaskade die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen, folglich kommt es zur Vasodilatation.

3.5.3 Prüfen der Wirkung von Sulodexid auf das Endothel retinaler Arteriolen

Die Durchführung der Experimente erfolgte analog. Für die Inkubation wurde Sulodexid (Vessel Due F; Alfasigma S.p.A., Bologna, Italien) 30 mg/ml mit HG (25 mM D-Glukose) oder NG (5,5 mM D-Glukose) zu der Konzentration 50 μ g/ml verdünnt.

3.5.4 Testung unterschiedlicher Sulodexid-Konzentrationen zur Dosisfindung

1. Sulodexid-Lösung 50 μ g/ml
2. Sulodexid-Lösung 5 μ g/ml
3. Sulodexid-Lösung 0,5 μ g/ml

In allen Gruppen wurde eine Anzahl (n) von acht retinalen Arteriolen erster Ordnung in die Studie einbezogen.

3.6 Nachweis der Genexpression prooxidativer Gene auf mRNA-Ebene

Um Hyperglykämie-induzierte Veränderungen in der Expression von Genen zu bestimmen, wurde die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) genutzt. Bedingt durch die sehr kleinen Arteriolen und daher geringen verfügbaren Nukleinsäuremengen können so durch Amplifikation auch bei kleinsten mRNA-Mengen selektiv veränderter prooxidativer Redoxenzyme bestimmt werden. Ergänzend können diese mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf Proteinebene untersucht werden. So ist es möglich, zum einen pathophysiologische Mechanismen bei Hyperglykämie, aber auch potenzielle Wirkweisen der Substanz Sulodexid zu identifizieren. Zur Vorbereitung wurden acht Retinae pro Gruppe wie oben dargestellt zügig abgelöst und anschließend in einer Perfusionskammer kanüliert und mit folgenden Substanzen durchspült: Hochkonzentrierte Glukoselösung (HG, DMEM-High Glucose; 25 mM) +/- Sulodexid (50 µg/ml); normalkonzentrierte Glukoselösung (NG; DMEM-Low Glucose; 5,5 mM) +/- Sulodexid (50 µg/ml). Die Retinae wurden auf eine Inkubationsplatte transferiert und für zwei Stunden in den genannten Lösungen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Netzhautarteriolen zügig von Retinagewebe gesäubert, in DPBS gewaschen und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, DE) in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C für die weitere Verarbeitung gelagert. Gemäß dem Protokoll der bereits publizierten und etablierten Methode der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurden die Niveaus folgender prooxidativer Redoxgene ermittelt: NOX2, NOX4, NOX5. Die Besonderheit dieser Methode liegt in der Möglichkeit, den gesamten Prozess der PCR in Echtzeit zu überwachen, während die Daten einer herkömmliche PCR erst nach Beendigung des Prozesses gewonnen werden. Zunächst wurde die RNA mit Hilfe des E.Z.N.A. total RNA Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, USA) aus den isolierten Netzhautgefäßen extrahiert. Die reverse Transkription der gesamten RNA (1 µg) erfolgte mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Die qPCR erfolgte daraufhin in einem iCycler iQ System (Bio-Rad Laboratories, München, DE) mit Hilfe des Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix Kit (Thermo Fischer Scientific, Surrey, UK). Die verwendeten Primer-Sequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Zur relativen mRNA-Quantifizierung wurde die Vergleichsschwellenzyklus (Ct)-Methode angewendet (69). Die Genexpression wurde auf TATA-Box bindende Proteine (TBP) der mRNA normalisiert. Anschließend wurde die Menge an gezielter mRNA-Expression in jeder Probe relativ zur Kontrolle dargestellt.

Tabelle 4: Verwendete Primersequenzen für die qPCR-Methode.

Gene	Primersequenzen
β-Aktin	F: TGGACTACCTCCTGTCTGCT R: CCTAGGGGTGGGTTTCTGTG
NOX2	F: CACTTCACGCCACGATTCAC R: TTGACTCGGGCGTTCACAC
NOX4	F: GTCCCAGTGTGTCTGCGTTAG R: TCTCGAAATCGTTCTGTCCAGTC
NOX5	F: AAGAGTCCTTCTTTGCTGAGAGA R: CAGCCAGTGAACAGCACTGA

Legende: F: Forward, R: Reverse

3.7 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium-Färbung

Vorherige Studien beschrieben reaktive Sauerstoffspezies im Kontext der diabetischen Retinopathie als einen der zentralen pathophysiologischen Mechanismen der Netzhautschädigung. Diese können mit Hilfe der Substanz Dihydroethidium (DHE) quantifiziert werden. Als zellpermeable Substanz wird Dihydroethidium von reaktiven Sauerstoffspezies (v.a. dem Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$) oxidiert, wodurch das reaktive Produkt 2-Hydroxyethidium entsteht. Dieses interkaliert mit der DNA des Zellkerns und führt so zu einer roten Fluoreszenz. Mit Hilfe eines standardisierten Algorithmus konnte die Emission der resultierenden roten Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert und der oxidative Stress in den untersuchten retinalen Arteriolen ermittelt werden (70). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität gelang mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Für die DHE-Färbungen wurde eine mittels Verdünnungsreihe hergestellte 5 μ M-Lösung verwendet. Von den gewonnenen Netzhautarteriolen wurde jeweils nach der Inkubation mit hochkonzentrierter oder normalkonzentrierter Glukoselösung +/- Sulodexid ein kurzes Segment entnommen ($n = 8$ pro Gruppe), in einem Kryomold in Tissue-Tek O.C.T (beide Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, NL) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden Kryoschnitte (10 μ m dick) mit einer Kryomaschine (Leica Reichert Jung, 2030; Leica, Rijswijk, Niederlande) angefertigt und diese auf Objektträger (SuperFrost Plus™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgebracht. Nach Platzierung der vorbereiteten Objektträger mit aufgetragenen Kryoschnitten in einer Feuchtkammer erfolgte in einem abgedunkelten Raum (Fotosensibilität des DHE) vorsichtig das Auftragen der DHE-Lösung IV (1 ml pro Objektträger) auf die Objektträger. Anschließend wurde die Feuchtkammer verschlossen und bei 37 °C in einem Brutschrank (VWR International, Radnor, USA) inkubiert.

Nach 30 Minuten wurden die Objektträger vorsichtig aus der Feuchtkammer entnommen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Fluoreszenzintensität konnte anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TS 100; Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN), welches mit einer digitalen Mikroskopkamera DS-Fi1-U2 (Nikon) und einem ELWD 20x/0,45 S Plan Fluor Ph1 ADM-Objektiv (Nikon) ausgestattet war, visuell erfasst werden. Anschließend erfolgte die Aufnahme mittels der Bildgebungssoftware NIS Elements (Nikon, Version 1.10 64 bit; Einstellung: TRITC Filter, Belichtung 330 ms, Steigerung 2x), sowie die Messung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

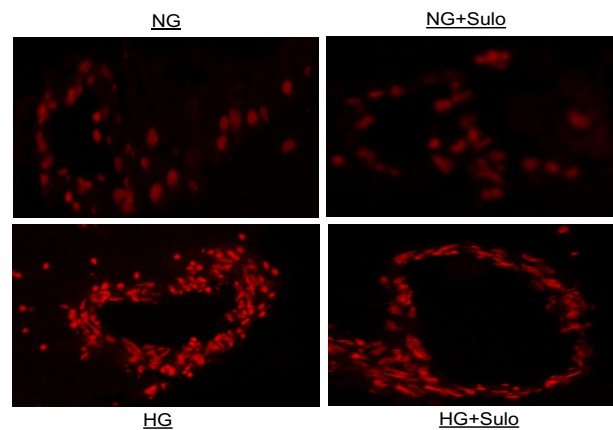


Abbildung 10: Fotografie einer DHE-Färbung in den Gruppen HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid).

3.8 Nachweis der Genexpression prooxidativer Gene auf Proteinebene

Zur Fixierung vorbereiteter Kryoschnitte wurden die Objektträger in Glasküvetten für 20 Minuten in 4 % PFA (Paraformaldehyd; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgte die dreimalige Waschung mit PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Daraufhin wurden die Objektträger in eine Feuchtkammer gelegt, vorsichtig abgetupft, mit Blocking Medium, bestehend aus 10 ml PBS + 0,1 % Triton X-100 + 1 % BSA (beide Sigma-Aldrich®, Steinheim, DE), bedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper (1:100 in Blocking Medium verdünnt) aufpipettiert und anschließend zwei Stunden inkubiert. Nach erneuter dreimaliger PBS-Waschung wurde der Sekundärantikörper (Rhodamin Red-X-coupled, goat-anti Rabbit polyclonal secondary antibody; Dianova GmbH, Hamburg, DE) zur Konzentration 1:200 mit PBS verdünnt und in Dunkelheit (Fluoreszenz) aufgegeben. Nach einer Stunde Inkubationszeit erfolgte die erneute PBS-Waschung. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; BIOZOL Diagnostica Vectashied Vertrieb GmbH, Eching, DE) wurde als Fluoreszenzfarbstoff zur Sichtbarmachung der DNA appliziert und die Objektträger final mit einem Deckglas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

bedeckt. Folgende Primärantikörper wurden für unterschiedliche Antikörperfärbungen nach gleichem Schema verwendet: NOX2 (ab80508), NOX4 (ab154244), NOX5 (ab191010). Die Fluoreszenzintensität wurde anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TS 100; Nikon, Yurakucho, Tokio, JPN), welches mit einer digitalen Mikroskopkamera DS-Fi1-U2 (Nikon) und einem ELWD 20x/0,45 S Plan Fluor Ph1 ADM-Objektiv (Nikon) ausgestattet war, visuell erfasst. Anschließend erfolgte die Aufnahme mittels der Bildgebungssoftware NIS Elements (Nikon, Version 1.10 64 bit, Einstellungen: Filter DAPI, Belichtung 333 ms, Steigerung 1.4x; Filter TRITC, Belichtung 300 ms, Steigerung 1.4x), sowie die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) wie in Abbildung 11 A-C dargestellt.

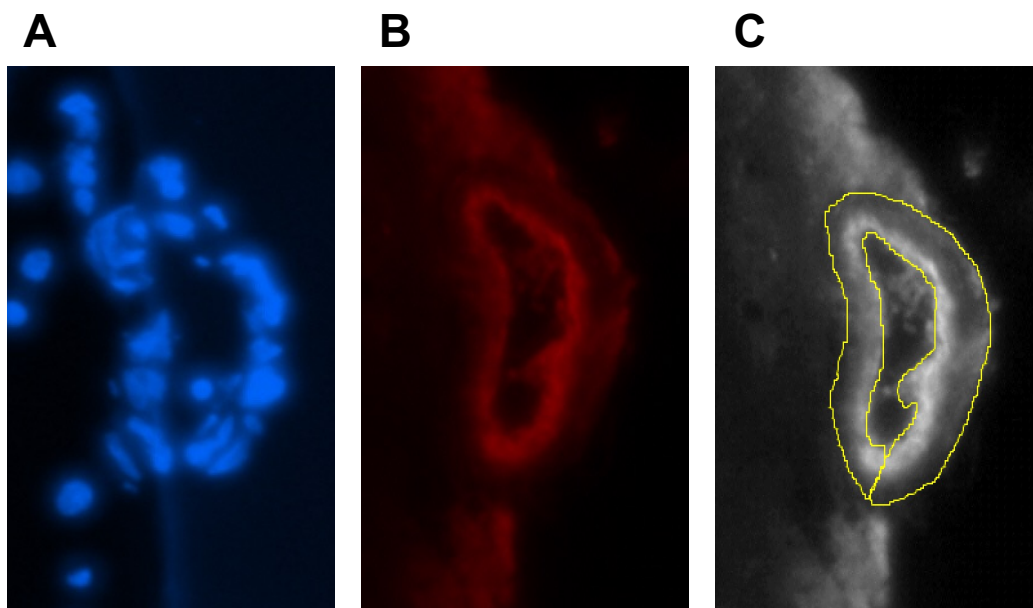


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Quantifizierung von Leuchtintensitäten mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ-Software (Freeware, Entwickler Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) am Beispiel einer NOX2-Immunfluoreszenzfärbung eines Kryoschnitts einer mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glukose) inkubierten retinalen Arteriole. **A** DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe), **B** Rhodamin Red-X-gekoppelter Sekundärantikörper (rote Farbe), **C** Umfahre der Gefäßwand (Typ: 16-bit) zur Quantifizierung der Leuchtintensität.

3.9 Statistische Analyse

Vaskuläre Konzentrations-Reaktivitätskurven wurden durch Zwei-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen verglichen. Für jede Konzentration wurde ein Tukey-Test verwendet, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu identifizieren.

Die Darstellung der Reaktionen auf U46619, Bradykinin und SNP erfolgte als relative Änderung des Gefäßdurchmessers gegenüber dem Ausgangsdurchmesser. Pro Gruppe entspricht die Anzahl der gemessenen Gefäße $n = 8$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben.

Für die Auswertung der PCR-Daten sowie der DHE- und Immunfärbungen wurde zur statistischen Auswertung die Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) und der Tukey-Test verwendet, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu identifizieren.

Für die PCR-Methode wurden die Arteriolen aus $n = 8$ Schweineretinae pro Gruppe verwendet. Die Anzahl der porcinen retinalen Arteriolensegmente für die DHE- und Immunfärbungen beträgt $n = 8$ pro Gruppe.

Das Signifikanzniveau wurde jeweils auf 0,05 festgelegt.

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad PRISM (Version 9, GraphPad Inc., San Diego, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Gefäßstudien retinaler Arteriolen

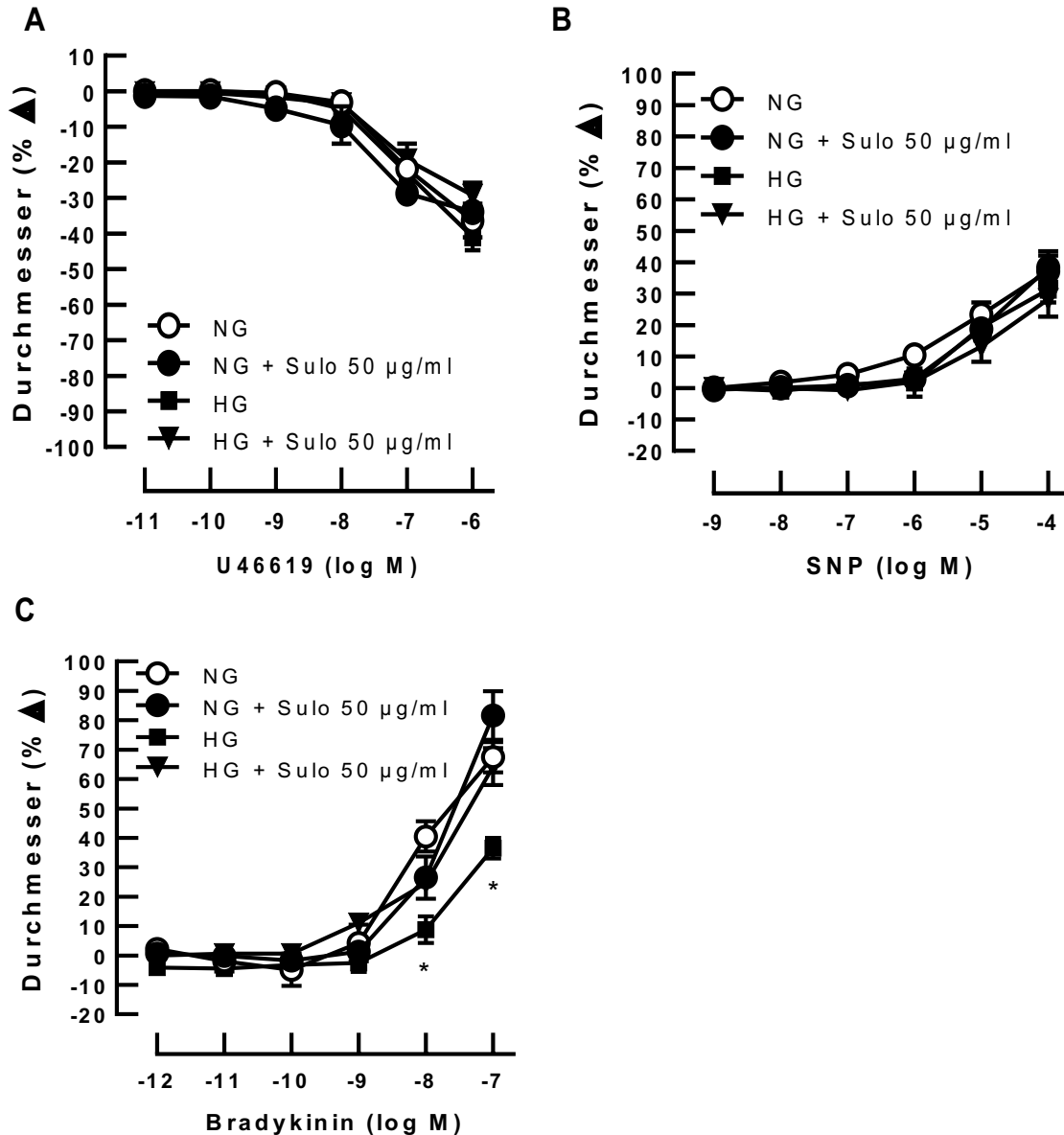


Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Reaktionen retinaler Arteriolen nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid) auf **A** U46619, **B** den endothelunabhängigen Vasodilatator SNP und **C** den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE ($n = 8$ pro Konzentration und Gruppe; * $p < 0,05$, HG im Vergleich zu allen anderen Gruppen) angegeben. X-Achse: Konzentration vasoaktiver Pharmaka in (log M), y-Achse: Relative Änderung des Gefäßdurchmessers in % des Ausgangsdurchmessers.

Nach zweistündiger Inkubation der retinalen Arteriolen mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG, 25 mM D-Glukose) zeigte sich in der Gefäßantwort auf den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin bei den Konzentrationen 10^{-8} mol/l und 10^{-7} mol/l eine signifikante

Verminderung gegenüber den gemessenen Werten in der Kontrollgruppe (NG, 5,5 mM D-Glukose) ($p < 0,05$, Abbildung 12C).

Bemerkenswerterweise wurde bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Wirkstoff Sulodexid (HG + Sulodexid 50 $\mu\text{g/ml}$) bei den entsprechenden Bradykininkonzentrationen eine vasodilatatorische Gefäßantwort induziert, welche sich auf gleichem Niveau mit den Gefäßen der Kontrollgruppen NG und NG + Sulodexid 50 $\mu\text{g/ml}$ befand ($p < 0,05$).

Die durch den endothelunabhängigen Vasodilatator SNP (Nitroprussid-Natrium-Dihydrat) induzierte Gefäßreaktivität zeigte in allen Gruppen vergleichbare Kurvenverläufe (Abbildung 12B).

Das Thromboxanmimetikum U46619 löste in allen Gruppen eine vasokonstriktorische Antwort auf gleichem Niveau aus (Abbildung 12A).

4.2 Dosisfindungsstudien für den Wirkstoff Sulodexid

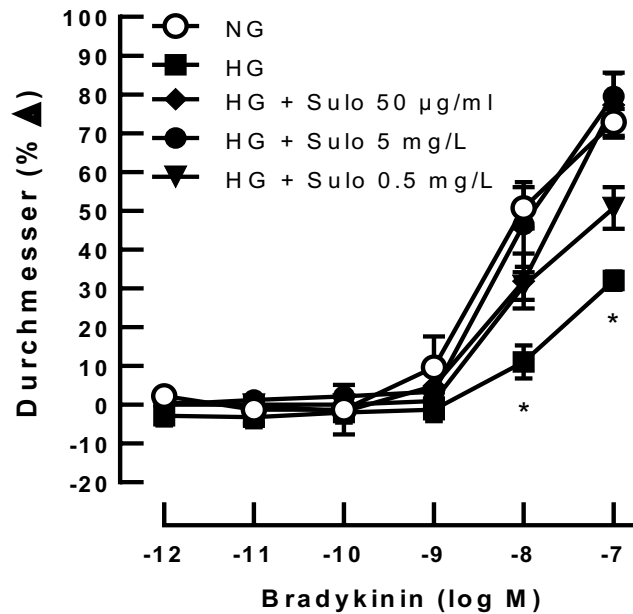


Abbildung 13: Gefäßreaktivität retinaler Arteriolen auf den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin nach Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung und unterschiedlichen Sulodexidkonzentrationen: 50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml. Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung, 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Konzentration und Gruppe; * p < 0,05, HG im Vergleich zu allen anderen Gruppen) angegeben. X-Achse: Konzentration vasoaktiver Pharmaka in (log M), y-Achse: Relative Änderung des Gefäßdurchmessers in % des Ausgangsdurchmessers.

Bei der Testung unterschiedlicher Sulodexidkonzentrationen (50 µg/ml, 5 µg/ml, 0,5 µg/ml) zeigte sich in allen Gruppen ein signifikanter Einfluss auf die durch den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin-induzierte Gefäßantwort (bei den Konzentrationen Bradykinin 10^{-8} mol/l und 10^{-7} mol/l) retinaler Arteriolen im Vergleich zur HG-Gruppe ($p < 0,05$, n = 8 pro Gruppe).

4.3 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

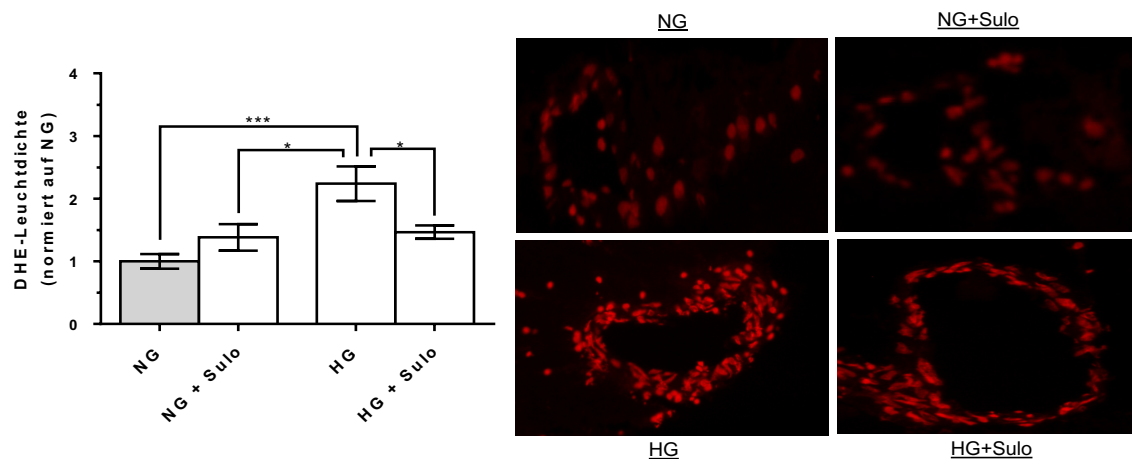


Abbildung 14: DHE-Färbungen retinaler Arteriolen im Querschnitt (Kryoschnitte) nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (NG + 50 µg/ml Sulodexid). **Rechte Seite:** Fluoreszenzmikroskopische Fotografien der DHE-Färbungen. **Linke Seite:** Gemessene Leuchtintensitäten normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) angegeben.

Die DHE-Fluoreszenzintensität (Abbildung 14) bei den mit hochkonzentrierter Glukoselösung-inkubierten retinalen Arteriolen (HG) war im Vergleich zu den Kontrollgruppen NG (p < 0,001) und NG + Sulodexid 50 µg/ml Sulodexid (p < 0,05) um mehr als das Doppelte erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der HG + 50 µg/ml Sulodexid-Gruppe eine signifikant verminderte Leuchtintensität verglichen mit HG-Gefäßen (p < 0,05).

4.4 Quantifizierung der NOX-Genexpression auf mRNA-Ebene

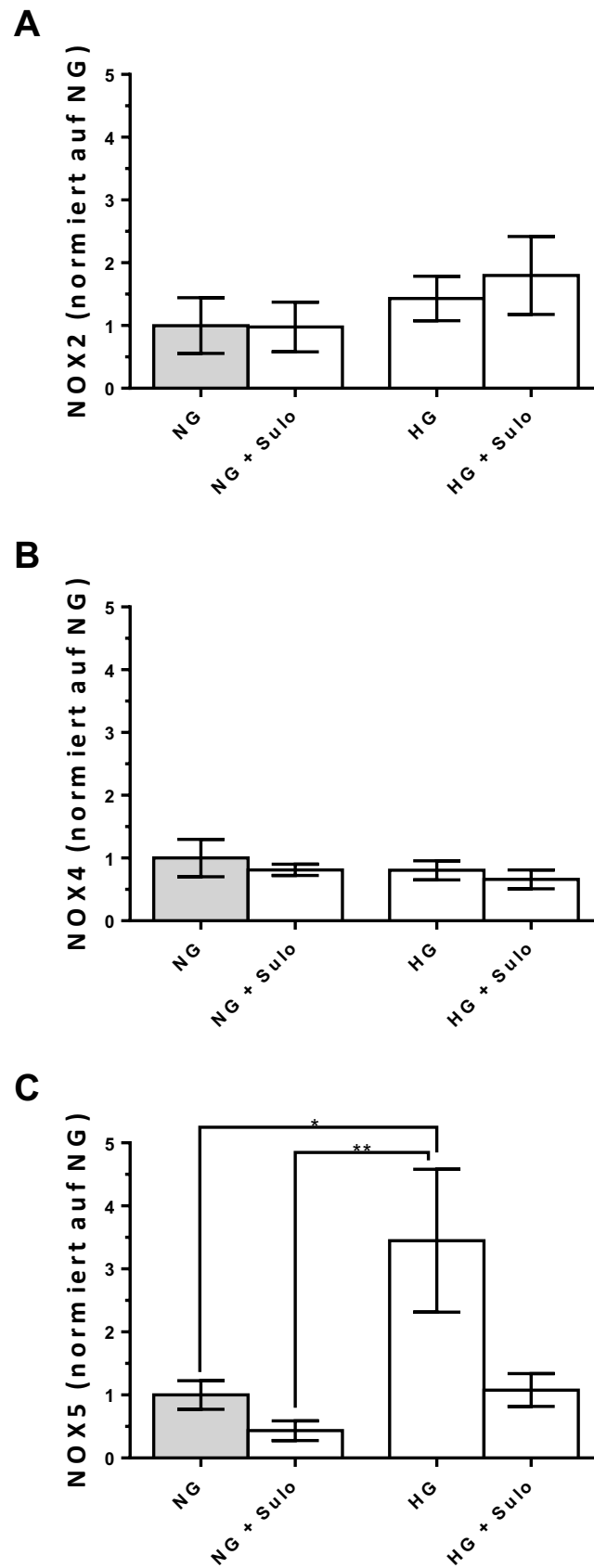


Abbildung 15: Boten-RNA-Expression (mRNA) der Gene prooxidativer Redox-Enzyme (**A** NOX2, **B** NOX4, **C** NOX5) nach zweistündiger Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (NG + 50 µg/ml Sulodexid). Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) angegeben. Die mRNA-Expressionsniveaus sind jeweils normiert auf die Kontrollgruppe NG dargestellt.

Bei der Analyse der Boten-RNA-Expression für die NOX4 und NOX2 zeigten sich keine signifikanten gruppenspezifischen Unterschiede.

Die NOX5-mRNA-Expression war hingegen nach Inkubation der Arteriolen mit hochkonzentrierter Glukoselösung signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollgruppen NG (p < 0,05) und NG + 50 µg/ml (p < 0,01) Sulodexid. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Sulodexid-abhängiger Effekt.

4.5 Quantifizierung der NOX-Genexpression auf Proteinebene

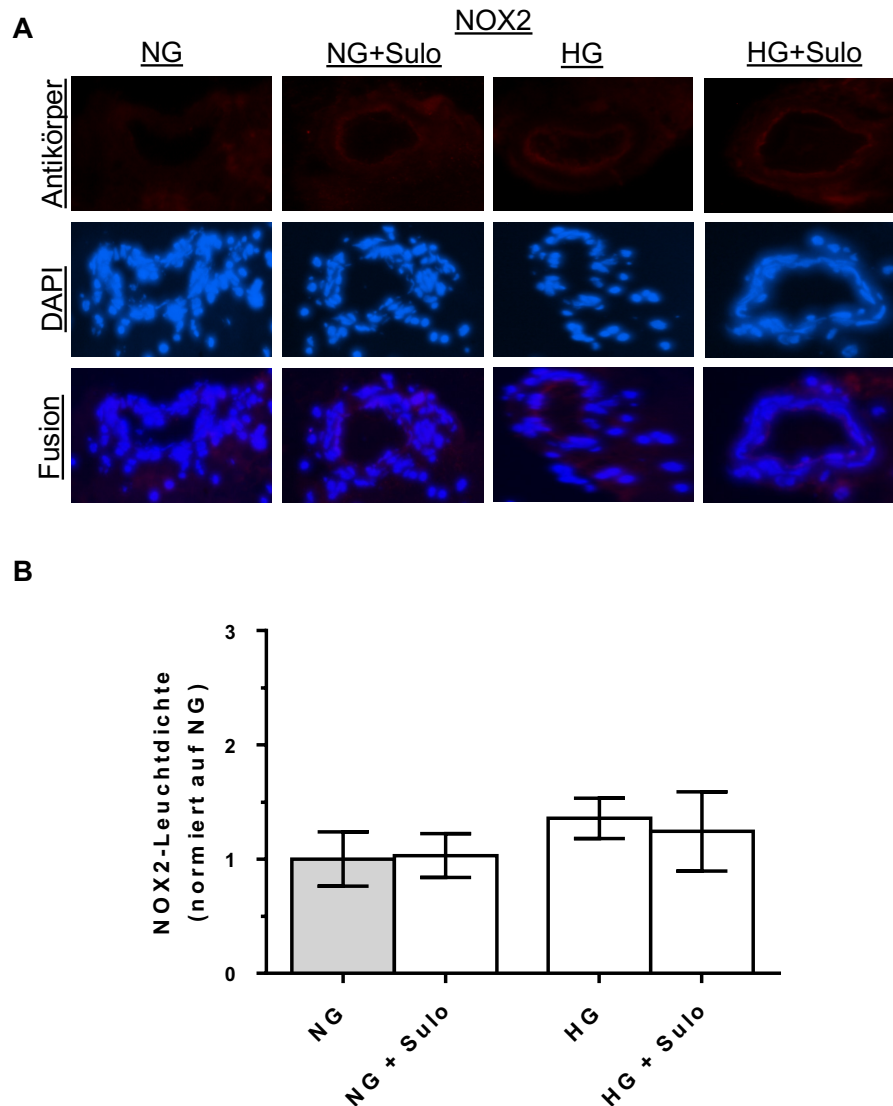


Abbildung 16: **A** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX2 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengefügte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid). **B** Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben.

Zum Nachweis möglicher Glukose- und Sulodexid-abhängiger Effekte auf die NOX2-Proteinexpression diente eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen NOX2 gerichteten Primärantikörper. Abbildung 16A zeigt die dazugehörigen immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen retinaler Arteriolen. Abbildung 16B bildet die Quantifizierung der gemessenen Leuchtintensitäten in der Gefäßwand ab. Es wurden keine signifikanten gruppenspezifischen Unterschiede beobachtet.

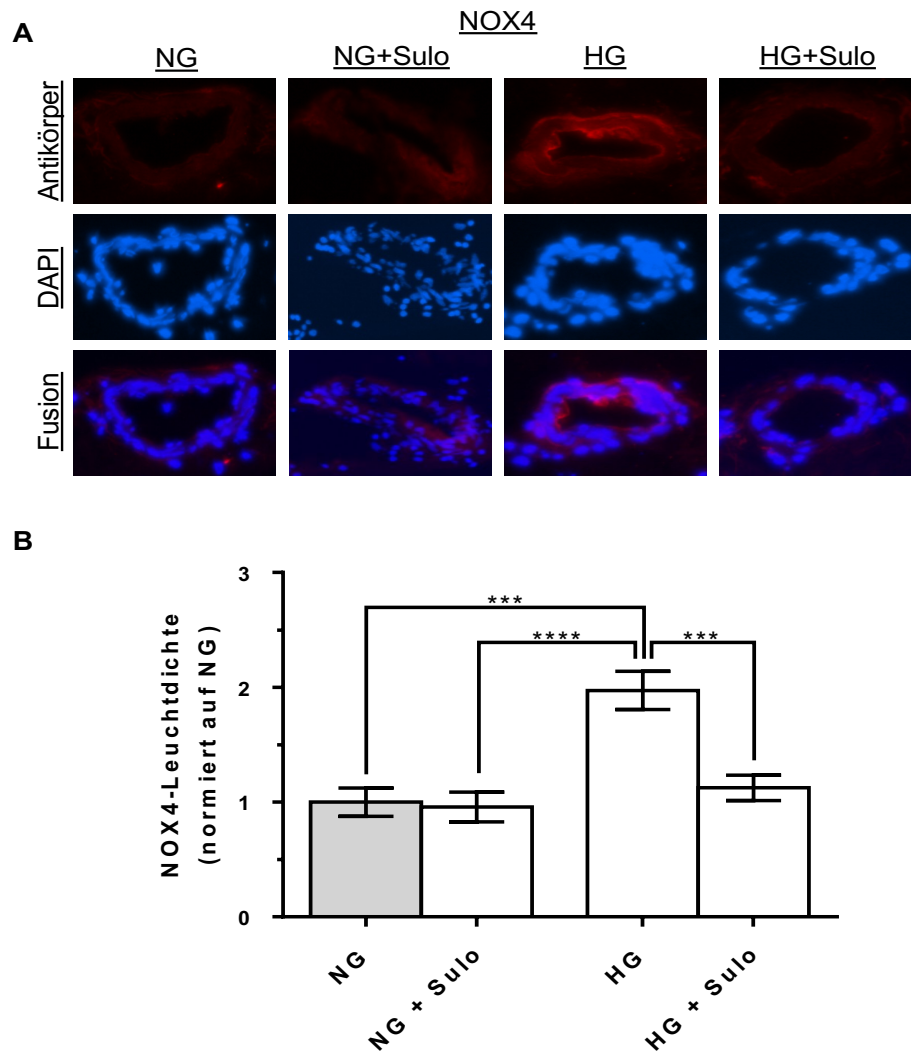


Abbildung 17: A Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX4 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengesetzte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid. **B** Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben

Zum Nachweis möglicher Glukose- und Sulodexidabhängiger Effekte auf die NOX4-Proteinexpression diente eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen NOX4 gerichteten Primärantikörper. Abbildung 17A zeigt die dazugehörigen immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen retinaler Arteriolen. Abbildung 17B bildet die Quantifizierung der gemessenen Leuchtintensitäten in der Gefäßwand ab. In der HG-Gruppe wurde eine signifikant ($p < 0,001$) erhöhte Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrollgruppe (Normalkonzentrierte Glukoselösung) und der Gruppe NG + Sulodexid 50 µg/ml ($p < 0,0001$) gemessen. Bemerkenswerterweise zeigte sich bei den HG + Sulodexid (50 µg/ml) inkubierten retinalen

Arteriolen eine um das Zweifache reduzierte Leuchtdichte gegenüber der HG-Gruppe ($p < 0,001$).

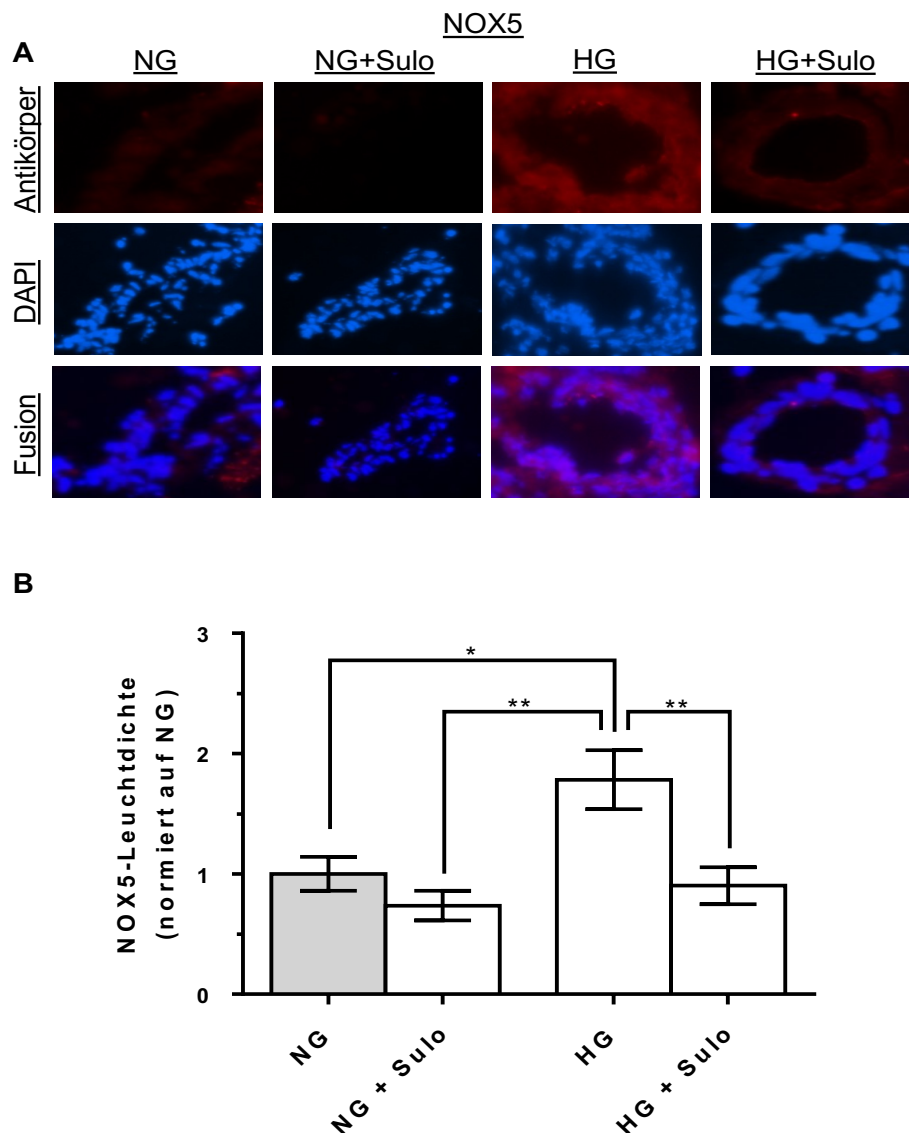


Abbildung 18 A Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen retinaler Arteriolen (Kryoschnitte) nach Immunfärbung mit einem gegen NOX5 gerichteten Primärantikörper und einem Rhodamin Red-X-gekoppelten Sekundärantikörper (rote Farbe). DAPI: DNA-Färbung (blaue Farbe). Fusion: Zusammengesetzte Fotos. Gruppen: Zweistündige Inkubation mit HG (Hochkonzentrierte Glukoselösung; 25 mM D-Glukose), HG + Sulo 50 µg/ml (Hochkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid), Kontrollen: NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glukose), NG + Sulo 50 µg/ml (Normalkonzentrierte Glukoselösung + 50 µg/ml Sulodexid. **B** Quantifizierung der Leuchtintensitäten retinaler Arteriolen normiert auf NG. Die Daten sind als Mittelwert ± SE (n = 8 pro Gruppe; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001) angegeben.

Zum Nachweis möglicher Glukose- und Sulodexid-abhängiger Effekte auf die NOX5-Proteinexpression diente eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem gegen NOX5 gerichteten Primärantikörper. Abbildung 18A zeigt die dazugehörigen immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen retinaler Arteriolen. Abbildung 18B bildet die Quantifizierung der gemessenen Leuchtintensitäten in der Gefäßwand ab.

Die Quantifizierung der Leuchtintensitäten ergab ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal beim Vergleich HG versus NG (p < 0,05) und versus NG + Sulodexid 50 µg/ml (p < 0,01). In

der HG + Sulodexid- Gruppe 50 µg/ml zeigte sich hingegen eine um etwa das Zweifache reduzierte Leuchtdichte im Vergleich zu HG-inkubierten retinalen Arteriolen ($p < 0,01$).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung zentraler Erkenntnisse

Das Ziel dieser Dissertation war es, eine mögliche protektive Wirkung des Wirkstoffs Sulodexid auf eine Hyperglykämie-induzierte endotheliale Dysfunktion nachzuweisen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Sulodexid oxidativen Stress reduziert und welche Mechanismen dahinterstecken könnten. Zusammenfassend lieferte die Studie die folgenden zentralen Erkenntnisse:

1. Hochkonzentrierte Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glukose) induziert im In-vitro-Schweinmodell bereits nach einer zweistündigen Inkubation eine endotheliale Dysfunktion retinaler Arteriolen.
2. Die Entstehung von oxidativem Stress wurde durch den vermehrten Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium-Färbung gezeigt.
3. Die gleichzeitige Inkubation mit dem Wirkstoff Sulodexid schützt retinale Arteriolen vor einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion und reduziert oxidativen Stress.
4. Mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Immunfluoreszenzverfahren konnte die Expression prooxidativer Redoxgene (NOX2, NOX4, NOX5) auf mRNA- und Proteinebene quantifiziert werden
 - a. Die NOX4- und NOX5- Proteinexpression waren in der HG-Gruppe signifikant erhöht.
 - b. Sulodexid zeigte einen signifikanten Einfluss auf die NOX4- und NOX5- Proteinexpression bei HG-Gefäßen.
 - c. Auf mRNA-Ebene zeigten sich nur in der NOX5-Expression nach Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung signifikante Veränderungen, Sulodexid-assoziierte Effekte konnten hingegen nicht beobachtet werden.

5.2 Eigene Ergebnisse im Kontext anderer Studienergebnisse

5.2.1 Sulodexid schützt vor einer Hyperglykämie-induzierten Endotheldysfunktion

Die Integrität des vaskulären Endothels ist essenziell für eine bedarfsgerechte Perfusion der Retina. Der Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und der Entstehung sehbeeinträchtigender Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie ist Gegenstand aktueller Forschung (71, 72). Für die Endothelschädigung bei diabetischer Retinopathie ist eine anhaltende Hyperglykämie maßgeblich verantwortlich. Dabei scheint die Empfindlichkeit vaskulärer Endothelzellen gegenüber hohen Glukosekonzentrationen insbesondere in einer fehlenden Anpassung der Glukosetransportrate im Unterschied zu anderen Zelltypen begründet zu sein (73). Bedingt durch den schwierigen Zugang zu vitalen humanen retinalen Endothelzellen und äußerst aufwändiger in vivo Untersuchungsmöglichkeiten sind Tiermodelle in der Erforschung der diabetischen Retinopathie von hohem Stellenwert. Obwohl aktuelle Studien pathologische Veränderungen in der Retina in Verbindung mit diabetischen Stoffwechsellagen darstellen konnten, gibt es bisher kaum Untersuchungen, die auf die endothelabhängige und endothelunabhängige Gefäßreaktivität retinaler Arteriolen mit ihren zugrundeliegenden Mechanismen bei akuter Hyperglykämie eingehen.

Mittels funktioneller Gefäßstudien wurde in der vorliegenden Forschungsarbeit eine signifikante endotheliale Dysfunktion retinaler Arteriolen bereits nach zweistündiger Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung (25 mM D-Glukose) gezeigt, die sich in einer Verminderung der Ansprechbarkeit auf die NO-vermittelte endothelabhängige Vasodilatation durch Bradykinin im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normalkonzentrierter Glukoselösung (5,5 mM D-Glukose) abbildet ($p < 0,05$). In der endothelunabhängigen Vasodilatation wurden hingegen keine gruppenabhängigen Unterschiede gemessen, was auf eine fehlende Beeinträchtigung der glatten Gefäßmuskelzellen hindeutet. Damit übereinstimmend wurde bereits im diabetischen Rattenmodell beschrieben, dass Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Vasodilatation retinaler Arteriolen durch Nitroprussid hat (74). Bemerkenswert ist, dass die Substanz Sulodexid retinale Arteriolen vor einer Hyperglykämie-induzierten endothelialen Dysfunktion schützen konnte ($p < 0,05$).

Eine selektive Beeinträchtigung der NO-vermittelten endothelabhängigen Vasodilatation an retinalen Arteriolen diabetischer Schweine wurde erstmalig 2012 von Hein et al. beschrieben (75). Als methodische Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen diente eine weitere Studie der genannten Arbeitsgruppe, welche die akuten Hyperglykämie-induzierten Schäden an Netzhautgefäßen des Schweins nach zweistündiger Glukoseinkubation mittels Gefäßstudien in vitro untersuchte. Beachtenswert ist, dass diese Methode im direkten Vergleich mit einem Streptozocin-induzierten Diabetesmodell (mit zweiwöchigen Blutzuckerkonzentrationen um 471 mg/dl) vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der

auftretenden endothelialen Dysfunktion retinaler Arteriolen lieferte (76). Dies lässt vermuten, dass das In-vitro-Schweinmodell als tierexperimentelles Modell zur Untersuchung Hyperglykämie-induzierter Endothelschäden geeignet ist, auch wenn dieses nur eine Annäherung an die komplexen pathophysiologischen Mechanismen bei einem Diabetes mellitus im lebenden Organismus darstellen kann.

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurde ebenfalls das Hausschwein (lat. *Sus scrofa domesticus*) als tierexperimentelles Modell ausgewählt, da die Retina von Schweinen bezüglich Anatomie, Vaskularisierung und Photorezeptorenverteilung eine hohe Vergleichbarkeit zur menschlichen Retina aufweist (77, 78). In-vitro-Studien zeigten, dass die Netzhautarteriolen beider Spezies in der Lage sind, auf den Anstieg des luminalen Blutflusses zu reagieren und eine NO-vermittelte Vasodilatation hervorzurufen. Dies spricht für ein geeignetes Modell in der ophthalmologischen Grundlagenforschung, dennoch ist nur eine bedingte Übertragung der Forschungsergebnisse auf den Menschen möglich.

Kritisch anzumerken ist die Verwendung hoher Glukosekonzentrationen zur Inkubation, sowohl bei der vorliegenden In-vitro-Studie als auch in vergleichbaren Hyperglykämie-Modellen. Die Konzentration von 25 mmol/l Glukose entspricht einem Blutzuckerwert von 450 mg/dl, der bei einer akuten Hyperglykämie auftreten kann, in diesem Maße jedoch nicht dauerhaft mit dem Leben vereinbar wäre. Diese hoch gewählte Glukosekonzentration ist vor allem der kurzen in vitro-Inkubationszeit im Vergleich zu einem langfristigen Diabetes mellitus geschuldet. Überraschend ist die Beobachtung, dass die Glukoseexposition bereits nach zweistündiger Inkubationszeit ausgeprägte funktionelle Beeinträchtigungen des Gefäßendothels verursacht. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass irreversible Endothelschäden bereits in frühen, asymptomatischen Stadien der diabetischen Retinopathie auftreten (79). Dies unterstreicht den dringenden Bedarf an therapeutischen Ansätzen, die das Fortschreiten und bestenfalls sogar Entstehung diabetischer Folgeerkrankungen in Zukunft verhindern könnten.

Im Einklang mit den gewonnenen Ergebnissen demonstrierten weitere Studien eine signifikante endotheliale Dysfunktion durch Hyperglykämie-induzierte Gefäßschäden. Guzman et al. beobachteten eine signifikante Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation auf Acetylcholin durch dreistündige Inkubation mit 25 mM D-Glukose an Aortenringen der Ratte (80). Erwähnenswert ist hierbei, dass porcine Arteriolen nur sehr schwach auf Acetylcholin reagieren, wohingegen die endothelabhängige Vasodilatation retinaler Arteriolen des Schweins am besten durch Bradykinin induziert werden kann (67, 68). Dies deutet darauf hin, dass aufgrund der Nutzung unterschiedlicher Tierspezies und Gefäßbetten oft nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit experimenteller Studienergebnisse

besteht. Unterschiede wurden beispielsweise in der Ansprechbarkeit auf Wirkstoffe, der Expression von Transportern oder auch der Zellmorphologie nachgewiesen (81).

Die Messung der Anzahl zirkulierender Endothelzellen sowie die Gefäßreaktivität auf endothelabhängige vasoaktive Substanzen ist geeignet, um eine endotheliale Dysfunktion als Zeichen von diabetischen Gefäßkomplikationen in experimentellen Modellen nachzuweisen (82). Der Wirkstoff Sulodexid konnte im diabetischen In-vivo-Rattenmodell das Endothel von Mesenterialarterien vor glukoseassoziierten Schäden schützen, die Anzahl zirkulierender Endothelzellen verringern und die endothelabhängige Vasodilatation von Mesenterialarterien verbessern (83). Aufgrund der fehlenden Möglichkeit der Untersuchung der molekularen Signalmechanismen des humanen retinalen Endothels *in vivo*, stellen humane Zellkulturstudien ein wichtiges Untersuchungsmedium dar. Giurdanella et al. demonstrierten an humanen retinalen Endothelzellen die Effekte einer Inkubation mit 25 mM D-Glukose durch eine verminderte Mitochondrienfunktion als Zeichen einer herabgesetzten Zellviabilität. Sulodexid steigerte die Zellviabilität in Dosen ab 60 µg/ml signifikant. Als Einschränkung der Methodik wurde jedoch auf die bekanntermaßen erhöhte Zellpermeabilität immortalisierter Endothelzellen hingewiesen (81). Des Weiteren konnte in aktuellen Studien eine reduzierte transendotheliale elektrische Resistenz (TEER, engl. transendothelial electric resistance) humaner retinaler Endothelzellen durch hyperglykämische Bedingungen als Ausdruck einer Schädigung der Blut-Retina-Schranke beobachtet werden. Diese verursacht eine erhöhte Zellpermeabilität. Sulodexid war in der Lage, die TEER im Rahmen der Studien signifikant zu steigern (8, 81). Darüber hinaus zeigte der Wirkstoff in klinischen Studien zur diabetischen Nephropathie (5, 6), sowie in Endothelzellkulturstudien unter Glukoseinkubation bereits günstige Effekte auf das Gefäßendothel (8, 84), die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch größtenteils unverstanden.

Insgesamt existiert nur eine geringe Anzahl publizierter funktioneller Gefäßstudien, welche an unterschiedlichen Gefäßbetten und Spezies durchgeführt wurden. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Forschungsarbeiten und verstärkt den dringlichen Bedarf an weiteren Untersuchungen zum besseren Verständnis Diabetes-induzierter vaskulärer Endothelschäden, die in Zukunft die Entwicklung neuer Therapiestrategien ermöglichen könnten.

5.2.2 Sulodexid reduziert das Auftreten Hyperglykämie-induzierter ROS

Mittels DHE-Färbungen wurde im Rahmen der durchgeführten Studie ein erhöhtes Vorkommen reaktiver Sauerstoffspezies, vorrangig des Superoxidanions ($O_2^{\cdot-}$), nach Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glucose) im Vergleich zur Kontrollgruppe NG (Normalkonzentrierte Glukoselösung; 5,5 mM D-Glucose) nachgewiesen. Dies spricht für die vermehrte Entstehung von Hyperglykämie-assoziiertem oxidativem Stress. Reaktive Sauerstoffspezies oxidieren die Substanz Dihydroethidium; das entstehende Produkt 2-Hydroxyethidium interkaliert mit der DNA des Zellkerns und führt zu einer roten Fluoreszenz. Dabei zeigten HG-Gefäße eine um mehr als das Doppelte erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu NG-Gefäßen ($p < 0,001$). Beachtenswert ist die Beobachtung, dass bereits nach zweistündiger Inkubation mit Sulodexid (HG + Sulodexid 50 μ g/ml) die Menge Hyperglykämie-assoziiertes ROS im Endothel retinaler Arteriolen signifikant vermindert werden konnte ($p < 0,05$).

Die Entstehung von oxidativem Stress ist ein Schlüsselprozess bei der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, wobei große Mengen reaktiver Sauerstoffspezies entstehen (39). Während ROS in physiologischen Mengen beispielsweise als Botenstoffe für zelluläre Signalwege fungieren, wurde das Auftreten überschüssiger ROS mit der Pathogenese des Diabetes mellitus (26), von Krebserkrankungen (25), oder auch dem Morbus Alzheimer (27) in Verbindung gebracht. Dabei sind ROS an der Induktion von endothelialer Dysfunktion, neuronaler Degeneration, Inflammation und Zelltod beteiligt. Eine Hyperglykämie-assoziierte ROS-Bildung beschrieben in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bereits mehrere Forschungsgruppen.

Cui et al. wiesen fluoreszenzmikroskopisch signifikant erhöhte ROS-Level in bovinen retinalen Endothelzellen und Perizyten nach Inkubation mit 23 und 30 mM D-Glukose im Vergleich zur Kontrollgruppe (5 mM D-Glukose) nach (28). Weiterhin wurden erhöhte ROS-Vorkommen unter hyperglykämischen Bedingungen an humanen retinalen Endothelzellen (8), humanen umbilikal venösen Endothelzellen (76, 85), sowie in einem In-vivo-Tiermodell an diabetischen Rattenaorten (86) gemessen. Die Substanz Sulodexid ist in der Lage, glukoseexponierte und seneszente humane umbilikale venöse Endothelzellen vor exzessiver ROS-Entstehung zu schützen (61, 87, 88). Beachtenswert ist, dass in der vorliegenden Studie erstmalig ein Sulodexid-assoziiertes Effekt auf ROS-Spezies nach zweistündiger Inkubationszeit beobachtet werden konnte, im Gegensatz dazu sind in der Literatur Inkubationszeiten von sechs Stunden bis mehrere Tage im In-vitro-Modell beschrieben.

5.2.3 Dosisfindungsstudien für den Wirkstoff Sulodexid

Im Rahmen von Dosisfindungsstudien wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche Sulodexid-Konzentrationen getestet: 50 µg/ml, 5 µg/ml und 0,5 µg/ml. Interessanterweise zeigte sich sowohl bei Sulodexid 50 µg/ml als auch erstmalig bei 5 µg/ml und 0,5 µg/ml ein signifikanter Einfluss auf die durch den endothelabhängigen Vasodilatator Bradykinin induzierte Gefäßantwort retinaler Arteriolen im Vergleich zur HG-Gruppe (Signifikanzniveau $p < 0,05$, $n = 8$ pro Gruppe). Die Testung der Wirksamkeit niedriger Sulodexiddosierungen ist vor allem im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendbarkeit bedeutsam, da in Studien bei regelmäßiger intravenöser Sulodexidgabe von 50-100 mg Plasmakonzentrationen von 0,5-1 µg/ml beobachtet wurden (49). Beeindruckend ist, dass bei oraler Gabe der gleichen Sulodexidmenge vergleichbare Plasmakonzentrationen gemessen werden konnten (49). Die Applikation von 100 mg Sulodexid täglich ist eine gängige Dosierung in klinischen Studien zur endothelprotektiven aber auch antithrombotischen Wirkung der Substanz (89-91). Jedoch scheinen auch höhere Dosierungen eine gute Verträglichkeit aufzuweisen (91, 92). Kritisch anzumerken ist, dass bisher keine standardisierten Dosierungen für die endothelprotektive Wirkung der Substanz vorliegen. Hierfür scheint vor allem die insgesamt geringe Datenlage, sowie die erschwerte Vergleichbarkeit durch die Heterogenität der publizierten klinischen und experimentellen Studien verantwortlich zu sein.

Besonders hervorzuheben ist die herausragende Möglichkeit zur oralen Absorption von Sulodexid im Vergleich zu anderen Heparinderivaten. Dies könnte für Patienten eine wenig invasive Therapiemöglichkeit bieten, welche auch im häuslichen Umfeld durchgeführt werden könnte. Sulodexid-Kapseln (25 mg) sind aktuell in einigen Ländern Osteuropas zugelassen. Bei der Therapie der diabetischen Nephropathie konnte in einer randomisiert kontrollierten Studie eine Albuminurie, die ebenfalls eine Folge endothelialer Dysfunktion darstellt, signifikant reduziert werden. Dieser Effekt wurde bei einer oralen Administration von 200 mg täglich über vier Monate beobachtet (91). In der „DRESS-Studie“ zur nicht proliferativen diabetischen Retinopathie reduzierte die orale Gabe von 50 mg täglich über 12 Monate das Auftreten makulärer harter Exsudate bei leichter bis mittelschwerer Erkrankung signifikant (93).

Die Auswahl der getesteten Sulodexid-Konzentrationen in der vorliegenden Forschungsarbeit orientierte sich an bereits veröffentlichten experimentellen Arbeiten in diesem Bereich. Gabryel et al. demonstrierten an ischämischen humanen umbilikalen venösen Endothelzellen bei 25-50 µg/ml Sulodexid mit einer Inkubationszeit von sechs Stunden signifikante endothelprotektive Effekte, jedoch nicht bei niedrigeren Dosierungen (88). Die Konzentration 50 µg/ml zeigte den stärksten antioxidativen Effekt, sowie eine Verminderung anfallender ROS und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (63, 87). Ciszewicz et al.

beschrieben darüber hinaus dosisabhängige endothelprotektive und antiinflammatorische Effekte von Sulodexid an Glukose-inkubierten venösen Endothelzellen. Niedrige Sulodexid-Konzentrationen konnten jedoch keine signifikante Reduktion von ROS im hyperglykämischen Milieu hervorrufen (61). Dabei ist kritisch anzumerken, dass in der vorliegenden Untersuchung nur die Konzentration Sulodexid 50 µg/ml im Hinblick auf einen Effekt in der ROS-Expression untersucht wurde.

Weiterhin lässt sich in Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und der bisher veröffentlichten Arbeiten eine Sulodexid-Wirkung an zahlreichen unterschiedlichen Spezies und Organen vermuten. Zusammenfassend konnten Sulodexid-Effekte an folgenden Spezies- und Organsystemen beobachtet werden: Humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVECS) (88), humanen retinalen Endothelzellen (HRECS), Nieren der Maus (53), Myokard von Mäusen (94), Rattenaortenringen (80, 83), Schweineretinae (76) oder auch Mesenterialgefäßen von Ratten (83).

5.2.4 Hyperglykämie führt zu NOX-abhängiger ROS-Produktion

Die entstandenen Hyperglykämie-assoziierten pathophysiologischen Veränderungen an den Netzhautgefäßen in der durchgeführten Studie und die richtungsweisende Identifikation vermehrter reaktiver Sauerstoffspezies ermöglichten es, spezifische Hyperglykämie-bezogene Veränderungen mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf mRNA-Ebene und mittels spezifischer Antikörperfärbungen auf Proteinebene zu analysieren.

Die Isoformen des endothelialen NADPH-Oxidase-Komplexes (NOX) sind als ROS-Produzenten von fundamentaler Bedeutung. NOX-Enzyme weisen unter physiologischen Bedingungen eine geringe Aktivität auf. Unter pathophysiologischen Zuständen kommt es jedoch zur Translokation der zytosolischen NOX-Untereinheit zur Zellmembran hin, wodurch es zu einer erhöhten katalytischen Aktivität kommt (95). Der Enzymkomplex wird über vasoaktive Substanzen, Zytokine, Wachstumsfaktoren und mechanische Kräfte reguliert (96). NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 wurden bereits mit der Entstehung einer Vaskulopathie bei diabetischer Retinopathie in Zusammenhang gebracht (37, 97). Sowohl In-vitro-Studien an aortalen Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und renalen Mesangiumzellen als auch ein In-vivo-Diabetesmodell der Maus konnte die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies über NADPH-Oxidasen bereits demonstrieren (37, 98). Bei Diabetes ist insbesondere das Superoxidanion von großer Bedeutung, das über unterschiedliche Pathomechanismen (siehe Abbildung 19) zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führt und damit maßgeblich eine endotheliale Dysfunktion induziert.

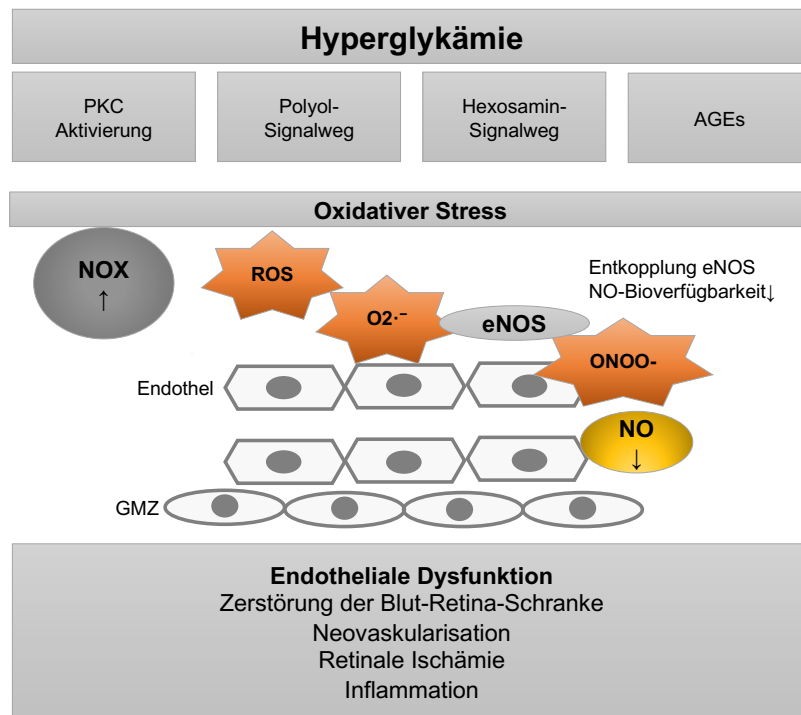


Abbildung 19: Eine anhaltende Hyperglykämie führt über unterschiedliche Signalwege zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Zeichen von oxidativem Stress. An der ROS-Entstehung in Endothelzellen sind NADPH-Oxidasen (NOX) maßgeblich beteiligt. Das Superoxidanion als wichtigster ROS-Vertreter in diesem Zusammenhang reagiert mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit (ONOO-), außerdem kommt es zu einer Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche daraufhin Superoxidanionen generiert. Folglich sinkt die Bioverfügbarkeit des endothelprotektiven Faktors NO. Legende: PKC: Proteinkinase C; AGE: advanced glycation end-products; GMZ: Glatte Muskelzellen.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung eine signifikant vermehrte Proteinexpression der NOX4 ($p < 0,001$) und NOX5 ($p < 0,05$) nach zweistündiger Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glukose) versus Inkubation mit normalkonzentrierter Glukoselösung (NG; 5 mM D-Glukose) in porcinen retinalen nachgewiesen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurden in der DHE-Färbung erhöhte ROS-Level beobachtet. Dies spricht für die Induktion von oxidativem Stress durch vermehrte Expression der NOX4 und NOX5 im hyperglykämischen Milieu, die in der durchgeführten Studie bereits nach kurzer Inkubationszeit eine signifikante endotheliale Dysfunktion retinaler Arteriolen hervorrief. Überraschenderweise zeigte sich in der mRNA-Expression der NOX-Gene lediglich ein signifikanter Einfluss auf die mRNA-Expression der NOX5, nicht jedoch auf die NOX4.

Überraschend ist, dass in der durchgeführten NOX2-Immunfluoreszenzfärbung kein signifikanter Effekt einer Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung auf die NOX2-Proteinexpression beobachtet wurde. Vorherige Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten eine essenzielle Rolle der NOX2 in der Entstehung von Sauerstoffradikalen im retinalen Endothel in einem okulären Ischämiemodell demonstrieren und diese erstmals im retinalen

Gewebe des Schweins im Zusammenhang mit Systemerkrankungen beobachten (99). NOX2 kommt in retinalen Endothelzellen und Perizyten vor, die bei diabetischer Retinopathie vornehmlich geschädigt werden (37, 100). Eine frühzeitig erhöhte NOX2-Aktivität in Verbindung mit hohen retinalen ROS-Leveln und der Induktion vaskulärer Inflamationsprozesse wurde bereits in bovinen retinalen Endothelzellen, in Retinae von Mäusen und Ratten im Streptozocin-Diabetesmodell sowie in Retinae von Patienten mit diabetischer Retinopathie post mortem nachgewiesen (101). Zusammenfassend scheint die NOX2-Aktivierung eine primäre ROS-Quelle und ein frühes Ereignis in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie darzustellen (36), jedoch konnte im vorliegenden Hyperglykämiemodell nach zweistündiger Inkubationszeit kein Einfluss auf die NOX2 nachgewiesen werden.

Bemerkenswerterweise gelang in der vorliegenden Studie der Nachweis einer signifikant erhöhten NOX4-Expression in HG- gegenüber NG- Gefäßen ($p < 0,001$), was auf eine glukoseabhängige Hochregulation der NOX4 hindeutet. Hierbei ist hervorzuheben, dass die NOX4 in diabetischen humanen retinalen Zellkulturlinien als primär exprimierte NOX-Isoform beschrieben wurde (102, 103). Unter hyperglykämischen- und hypoxischen Bedingungen scheint eine vermehrte NOX4-Aktivität für die Schädigung der Blut-Retina-Schranke und die Induktion von Neovaskularisationsprozessen (durch Induktion des Wachstumsfaktors VEGF) von großer Relevanz zu sein (102). Obwohl zahlreiche klinische und experimentelle Studien eine erhöhte NOX4-Expression mit der Pathogenese der diabetischen Retinopathie (104) und der diabetischen Nephropathie (105) in Verbindung bringen, bleiben die genauen Mechanismen dahinter unklar. Die Beobachtung, dass eine erhöhte NOX4-Expression auf mRNA- und Proteinebene im diabetischen Rattenmodell durch rezidivierende Insulingabe komplett reversibel war, ist ein weiterer wichtiger Hinweis auf einen glukoseassoziierten Effekt (106).

Die NOX5 wird wegen ihrer fehlenden Expression in retinalem Gewebe der Maus selten untersucht. Eine wichtige Besonderheit ist die Regulation der NOX5, die im Unterschied zu anderen Isoformen Ca^{2+} -abhängig und unabhängig von anderen Untereinheiten des Enzymkomplexes ist. In der vorliegenden Studie zeigte sich eine signifikant vermehrte NOX5-Proteinexpression durch Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung ($p < 0,01$). Die Bedeutung der NOX5 im Hinblick auf eine pathologisch erhöhte Zellpermeabilität und Neovaskularisationsprozesse bei diabetischer Retinopathie ist Gegenstand aktueller Forschung (97). Darüber hinaus konnte die vermehrte Expression der humanen NOX5 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen von transgenen Mäusen in Verbindung mit renalen Inflamationsprozessen beobachtet werden (107). Eine Hochregulation der NOX5 bei diabetischer Nephropathie in humanen Podozyten, die mit einer Störung der Filterbarriere einhergeht, wurde bereits demonstriert (108).

5.2.5 Einfluss von Sulodexid auf die Expression von NADPH-Oxidasen (NOX)

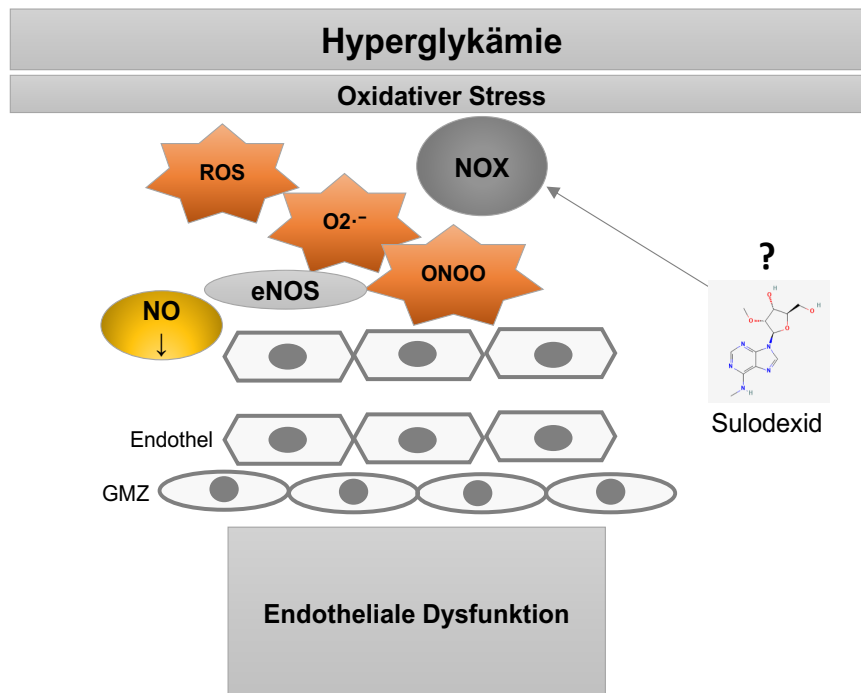


Abbildung 20: Mögliche Wirkweise von Sulodexid: Einfluss auf die Regulation prooxidativer Enzyme. Legende: Siehe Abbildung 19.

Die im Rahmen der vorliegenden Studie gefundenen protektiven Effekte von Sulodexid auf eine Hyperglykämie-induzierte endotheliale Dysfunktion und die signifikante Reduktion der ROS-Bildung führten zu der Hypothese, dass der Wirkstoff eine Wirkung auf die Gen- und Proteinexpression relevanter prooxidativer Enzyme haben könnte. In diesem Zusammenhang wurde ein möglicher Einfluss von Sulodexid auf die im Endothel vorkommenden Isoformen des NADPH-Oxidasekomplexes mittels qPCR- und Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

Zum aktuellen Zeitpunkt wurden bereits mehrfach antioxidative und endothelprotektive Eigenschaften des Wirkstoffs Sulodexid beschrieben, dennoch bleiben die zu Grunde liegenden Mechanismen bisher ungeklärt. Überraschend ist die Tatsache, dass bisher keine Publikationen vorliegen, die eine mögliche Wirkung von Sulodexid auf den NADPH-Oxidase-Komplex untersuchten.

Bemerkenswerterweise konnte in der vorliegenden Forschungsarbeit erstmalig eine durch hochkonzentrierte Glukoselösung verursachte NOX4- und NOX5-Expression durch Inkubation mit Sulodexid (HG + Sulodexid 50 $\mu\text{g/ml}$) auf Proteinebene signifikant vermindert werden. Im Kontrast dazu wurden auf mRNA-Ebene keine signifikanten Effekte beobachtet.

Obgleich es noch keine veröffentlichten Studien hinsichtlich eines möglichen Einflusses von Sulodexid auf die NOX-Expression gibt, konnten günstige Einflüsse einer NOX-Inhibition auf retinale Gefäßschäden insbesondere an Knockout-Tiermodellen und experimentellen Wirkstoffstudien beobachtet werden. Durch selektive Blockade der NOX2 sowie in einem

Knockout-Mausmodell konnte die herausragende Bedeutung der NOX2 sowohl bei akuten als auch chronischen retinalen vaskulären Inflammationsprozessen aufgezeigt werden (36, 37). Beachtlich ist die Beobachtung, dass eine medikamentös induzierte NOX2-Inhibition im Mausmodell inflammatorische Signalwege unterdrückte, die Blut-Retina-Schranke schützte und das Auftreten retinaler Superoxidanionen verminderte (37, 109). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde jedoch keine signifikante Minderung der Hyperglykämie-assoziierten vermehrten NOX2-Expression gemessen. Dies spricht dafür, dass Sulodexid entweder keinen Effekt auf die Gen- und Proteinexpression der NOX2 induziert oder aber die Inkubationszeit oder Dosis zu niedrig gewählt war, um einen solchen Effekt zu beobachten.

Deliyanti et al. beschrieben erstmalig eine Reduktion diabetischer Netzhautschäden bei gleichzeitiger Hypertension durch duale Inhibition der NOX1 und NOX4 im Mausmodell, welche sich in einer verminderten Zellpermeabilität im Sinne einer Endothelprotektion darstellte. In diesem Zusammenhang kam es durch Inhibition der beiden Enzyme, aber auch durch RNA-Inaktivierung der NOX5 an murinen und bovinen Endothelzellkulturstudien zur Herunterregulation inflammatorischer Marker. In Zusammenschau dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren einen möglichen Therapieansatz im Rahmen der diabetischen Retinopathie durch NOX-Inhibition (110). Interessanterweise führte eine NOX4-Inhibierung auch bereits an humanen retinalen Endothelzellen zu einer signifikanten Reduktion von ROS-Leveln, die einen möglichen positiven Effekt dieses Ansatzes bei retinalen Vaskulopathien vermuten lässt (111). Eine herausragende Beobachtung stellte in diesem Zusammenhang der erstmalige Nachweis günstiger Effekte einer medikamentösen NOX4-Inhibition im Rahmen einer klinischen Studie zur Therapie von Patienten mit diabetischer Retinopathie dar (102). In Bezug auf die diabetische Nephropathie wurde dies bereits mehrfach beschrieben (110).

Überraschend ist die Beobachtung, dass in der vorliegenden Studie keine signifikanten Sulodexid-assoziierten Expressionsunterschiede der NOX4- und NOX5-Gene auf mRNA-Ebene beobachtet wurden. Im Rahmen von In-vivo-Studien beschrieben die Autoren zumeist eine gleichgerichtete Veränderung der NOX-Expression auf mRNA- und Proteinebene (99, 112, 113). Eine Expressionsveränderung auf Transkriptionsebene scheint vor allem bei langanhaltendem diabetischem Milieu aufzutreten, wie beispielsweise in In-vivo-Diabetesmodellen der Ratte (106). Hier zeigte sich nach mehrwöchiger Exposition eine erhöhte mRNA-Expression der NOX4 und p22phox-Untereinheit in diabetischen Rattennieren (102). Interessanterweise beobachtete die Forschungsgruppe in Mesangium-Endothelzellkulturen nach kurzfristiger hochkonzentrierter Glukose-Exposition (in den ersten drei Tagen) zwar erhöhte ROS-Level, jedoch keine Veränderung auf mRNA-Ebene. Überraschenderweise waren diese frühen Veränderungen durch gleichzeitige Inkubation mit einem NOX-Inhibitor vollständig reversibel. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Enzymexpression möglicherweise erst sekundär hochreguliert werde, nachdem initial

zunächst eine vermehrte Enzymaktivierung auftreten (106). Hierbei ist kritisch anzumerken, dass im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit keine Messung der Enzymaktivität erfolgte. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre hierbei, dass nach zweistündiger Inkubationszeit zunächst nur eine verstärkte Translation der mRNA stattfindet, die Transkription hingegen erst nach längerer Zeit hochreguliert wird. Sulodexid könnte in diesem Zusammenhang eine verminderte Translation der NOX-mRNA herbeiführen, diese Annahme ist jedoch als suggestiv zu betrachten.

Posttranskriptionelle Effekte können außerdem durch nicht-codierende RNA wie micro-RNAs verursacht werden, welche durch direkte mRNA-Bindung in der Lage sind, die Genexpression zu regulieren (114) und dadurch ebenfalls einen interessanten therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnten. Die genauen Einflüsse von mi-RNAs auf die NOX-Genexpression sind bisher unklar, jedoch wurde bereits gezeigt, dass miRNA-25 direkt an das humane NOX4-Gen bindet und eine Herunterregulation dieser unter diabetischen Bedingungen zu einer vermehrten ROS-Produktion führte (114, 115). Erwähnenswert ist die Tatsache, dass eine NOX-Inhibition auf vielen unterschiedlichen Signalwegen erreicht werden kann. Neben unspezifischen Mechanismen ist eine Wirkung auf die Proteinkinase C von Bedeutung, die die NOX-Aktivierung durch Blockade der Proteinphosphorylierung inhibieren kann (116).

Außerdem ist eine Glukose- und Sulodexid-assoziierte Wirkung auf einzelne NOX-Untereinheiten, speziell die bedeutende katalytische Untereinheit gp91-phox, aber auch die Interaktionen zwischen verschiedenen Untereinheiten denkbar (116). In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass die mRNA-Expression lediglich für einzelne Untereinheiten verändert ist, jedoch nicht in Bezug auf das Gesamt-Gen. Mittels spezifischer Antikörperfärbung könnte in zukünftigen Experimenten eine spezifische Markierung der Untereinheiten stattfinden, um dieser Frage nachzugehen. Die in der vorliegenden Forschungsarbeit verwendeten Antikörper sind am ehesten spezifisch für die Isoformen der gp91phox-Untereinheit.

Weiterhin denkbar wäre ein Einfluss von Sulodexid auf den proteasomalen Abbau von NOX-Enzymen. Diabetes mellitus führte im In-vivo-Experiment zu einer dysregulierten Aktivität des Ubiquitin-Proteasomen-Komplexes, welcher für den Abbau einer großen Anzahl intrazellulärer Enzyme verantwortlich ist. Hierdurch wurde eine verstärkte vaskuläre inflammatorische Antwort induziert, bei welcher der NFκB-Signalweg eine große Rolle spielt (117).

Von großer Bedeutung für den Abbau beschädigter und zellschädigender Proteine ist der Prozess der Autophagie. Durch vermehrten oxidativen Stress wird die Kontrolle des Autophagie-Stoffwechsels aufgehoben, folglich kommt es beispielsweise zu einer Anhäufung prooxidativer Enzyme wie beispielsweise den NOX. Antioxidative Enzyme wie die

Superoxiddismutasen oder auch die Katalase können diesem Prozess entgegenwirken (118). Möglicherweise beeinflusst Sulodexid die Autophagie unter oxidativen Stressbedingungen direkt oder indirekt. Falls Sulodexid die Regulation der Autophagie beeinflusst, sind zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, auf welchem Weg die Substanz dies erreichen könnte.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Studie bedeutende endothelprotektive und antioxidative Effekte des Wirkstoffs Sulodexid auf eine Hyperglykämie-induzierte Schädigung retinaler Arteriolen demonstriert werden. Bedeutende neue Erkenntnisse sind dabei die Hinweise auf eine Veränderung der NOX4- und NOX5- Proteinexpression durch Sulodexid, sowie eine Wirksamkeit der Substanz in den Dosierungen 50 µg/ml, 5 µg/ml und 0,5 µg/ml, die sich bereits nach kurzer Inkubationszeit entfaltet. Überraschend ist die Beobachtung, dass kein Einfluss von Sulodexid auf die mRNA-Expression der NOX-Gene nachgewiesen werden konnte. Die Ursache hierfür kann im Rahmen der aktuellen Studie nicht abschließend geklärt werden.

5.3 Grenzen der Experimente und Forschungsausblick

Retinagewebe ist äußerst heterogen und die Pathophysiologie der Hyperglykämie-induzierten Endothelschädigung äußerst komplex und in weiten Teilen bis heute unverstanden.

Die vorliegende In-vitro-Studie bot vor allem die Möglichkeit, Lokalmechanismen am Endothel retinaler porciner Arteriolen als Reaktion auf eine akute Hyperglykämie zu untersuchen. Diese Ergebnisse sind nicht uneingeschränkt auf In-vivo-Modelle übertragbar, bei denen komplexere Einflüsse auf die Gen- und Proteinexpression prooxidativer Enzyme zu erwarten sind. Im Folgenden sollte daher eine komplexe in-vivo-Untersuchung am diabetischen Tiermodell mit Sulodexidgabe über einen längeren Zeitraum etabliert werden, um die Wirkmechanismen von Sulodexid aufzuschlüsseln.

Eine weitere Schwäche der Studie ist, dass nur eine Auswahl prooxidativer Marker untersucht werden konnte, die folglich nur Hinweise auf mögliche pathophysiologische Prozesse unter HG-Inkubation und die möglichen Wirkmechanismen von Sulodexid geben können. Die Untersuchungen lassen nicht die Aufdeckung vollständiger Mechanismen auf molekularer Ebene zu. Möglicherweise beruht die antioxidative Wirkung der Substanz auf einer Regulation unterschiedlicher pro- und antioxidativer Gene. In diesem Zusammenhang demonstrierten Gabryel et al. 2016 erstmalig an humanen umbilikalen venösen Endothelzellen eine Hochregulation des bedeutenden antioxidativen Enzyms Superoxiddismutase 1 (SOD1) auf mRNA- und Proteinebene, die mit einer gesteigerten Enzymaktivität einherging. Weiterhin wäre aber auch eine direkte antioxidative Wirkung im Sinne eines ROS-Neutralisators denkbar. Darüber hinaus müssen komplexe antiinflammatorische Signalwege in Betracht gezogen werden, die im Rahmen dieser Untersuchung keine Berücksichtigung fanden.

Zahlreiche weitere experimentelle Studien sind notwendig, um die antioxidativen, antiinflammatorischen und endothelprotektiven Wirkmechanismen von Sulodexid aufzuschlüsseln. Außerdem ist es unabdingbar, den Wirkstoff in klinischen Studien an Patienten mit diabetischer Retinopathie auf seine Wirksamkeit und Verträglichkeit zu untersuchen. Dieser Wirkstoff könnte aufgrund der Möglichkeit zur oralen Gabe in Zukunft eine attraktive Therapiemöglichkeit für Patienten mit diabetischer Retinopathie darstellen, da auch eine organübergreifende protektive Wirkung, wie beispielsweise auf die diabetische Nephropathie, zu erwarten ist. Möglicherweise könnte Sulodexid auch im Rahmen der Primär- und Sekundärprävention anderer kardiovaskulärer Erkrankungen günstige Effekte aufweisen oder die Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse senken. In einer randomisiert kontrollierten Studie aus 2021 wurde bei COVID-19 Patienten eine Verbesserung des klinischen Outcomes beobachtet (119). Dies zeigt die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Wirkstoffs und den aktuellen Bedarf an weiteren experimentellen und klinischen Studien auf diesem Gebiet.

6 Zusammenfassung

Eine anhaltende Hyperglykämie als zentraler Aspekt eines Diabetes mellitus verursacht erhebliche Schäden am Gefäßendothel in verschiedenen Regionen des Körpers. In Bezug auf die Netzhautgefäße geht eine unzureichende Durchblutung mit einer Neurodegeneration einher, die zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens und sogar zur Erblindung führt (120). In diesem Zusammenhang war das Hauptziel dieser Studie, zu untersuchen, ob das Glykosaminoglykan Sulodexid vor Hyperglykämie-assoziierten Endothelschäden in retinalen Schweinearteriolen schützen kann. Zur Datenerhebung wurden funktionelle vaskuläre Studien an isolierten retinalen Arteriolen von Schweinen durchgeführt. Retinale Arteriolen wurden isoliert, kanüliert und für zwei Stunden in einem experimentellen Kreislaufsystem mit hochkonzentrierter Glukoselösung (HG; 25 mM D-Glukose) +/- Sulodexid (50/5/0,5 µg/ml) versus normalkonzentrierte Glukoselösung (NG; 5,5 mM D-Glukose) +/- Sulodexid (50 µg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die videomikroskopische Untersuchung der Endothelreaktivität auf vasoaktive Substanzen. DHE-Färbungen dienten dem Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Mittels Echtzeit-PCR (qPCR) gelang die Quantifizierung der mRNA-Expression prooxidativer (NOX2, NOX4, NOX5) Gene; anschließende Immunfluoreszenzfärbungen dienten dem Nachweis auf Proteinebene. Diese Studie erbrachte einige wichtige neue Erkenntnisse. Erstens verursachte die hochkonzentrierte Glukoselösung eine deutliche Beeinträchtigung der Bradykinin-assoziierten endothelabhängigen Vasodilatation nach nur zwei Stunden Inkubation, während die Reaktion auf SNP nicht beeinträchtigt wurde. Zweitens kam es in der HG-Gruppe zu einer signifikant erhöhten ROS-Bildung, welche für die Entstehung von oxidativem Stress spricht. Drittens schützte Sulodexid in den Dosierungen 50 µg/ml, 5 µg/ml und 0,5 µg/ml vor einer Hyperglykämie-assoziierten endothelialen Dysfunktion. Außerdem verhinderte der Wirkstoff die Entwicklung einer übermäßigen ROS-Produktion während der Inkubation mit hochkonzentrierter Glukoselösung. Viertens zeigte sich in der Immunfluoreszenzfärbung eine Erhöhung der Proteinexpression NOX4 und NOX5 in der HG-Gruppe, während die Expression der NOX4 und NOX5 in der HG + Sulodexid-Gruppe signifikant vermindert war. Überraschenderweise konnten die beschriebenen Effekte auf mRNA-Ebene nur für die NOX5-Expression bestätigt werden, nicht hingegen für die NOX4-Expression. Dies ist am Ehesten auf die kurze Inkubationszeit zurückzuführen, die für eine Änderung der Genexpression auf mRNA nicht ausreichend zu sein schien. Unklar bleibt hierbei, wie genau Sulodexid die Genexpression auf Proteinebene in kurzer Zeit verändern konnte. Dies sollte Gegenstand zukünftiger weiterer Forschungen sein. Beispielsweise könnte hierbei die Messung der Enzymaktivität berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist die Untersuchung antioxidativer Mechanismen unabdingbar.

Die vorliegende In-vitro-Studie bot vor Allem die Möglichkeit, Lokalmechanismen am Endothel retinaler porciner Arteriolen als Reaktion auf eine kurzzeitige Hyperglykämie zu untersuchen.

Im Folgenden sollte eine komplexe In-vivo-Untersuchung am diabetischen Tiermodell mit Sulodexidbehandlung über einen längeren Zeitraum etabliert werden, um die Wirkmechanismen von Sulodexid aufzuschlüsseln. In Zukunft könnte die Substanz in klinischen Studien günstige Effekte in der frühen Behandlung von Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie zeigen, welche bereits für die diabetische Nephropathie beschrieben wurden. Die Möglichkeit der oralen Absorption könnte eine attraktive Möglichkeit darstellen, Patienten weniger invasiv und frühzeitig zu behandeln und dem Progress der diabetischen Retinopathie durch endothelregenerative und protektive Effekte frühzeitig entgegenzuwirken.

Literaturverzeichnis

1. Ding J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Current diabetes reports*. 2012;12(4):346-54.
2. Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, Harris NR. Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology : the official journal of the International Society for Pathophysiology*. 2017;24(4):229-41.
3. Klaassen I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in retinal and eye research*. 2013;34:19-48.
4. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9735):124-36.
5. Weiss R, Niecestro R, Raz I. The role of sulodexide in the treatment of diabetic nephropathy. *Drugs*. 2007;67(18):2681-96.
6. Achour A, Kacem M, Dibej K, Skhiri H, Bouraoui S, El May M. One year course of oral sulodexide in the management of diabetic nephropathy. *Journal of nephrology*. 2005;18(5):568-74.
7. Broekhuizen LN, Lemkes BA, Mooij HL, Meuwese MC, Verberne H, Holleman F, et al. Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2010;53(12):2646-55.
8. Gericke A, Suminska-Jasińska K, Bręborowicz A. Sulodexide reduces glucose induced senescence in human retinal endothelial cells. *Scientific reports*. 2021;11(1):11532.
9. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
10. Jeppesen P, Aalkjaer C, Bek T. Bradykinin relaxation in small porcine retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(6):1891-6.
11. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(24):9265-9.
12. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-S74.
13. Institut RK. Gesundheit in Deutschland 2015 [08. Februar 2020]. Available from: Robert Koch-Institut (2015) Gesundheit in Deutschland.
14. Bundesärztekammer, Bundesvereinigung K, Fachgesellschaften AdWM. S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes. www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de; 2018.

15. Bundesärztekammer, Bundesvereinigung K, Fachgesellschaften AdWM. Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Nationale Versorgungsleitlinie. www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de; 2014.
16. Bundesärztekammer, Bundesvereinigung K, Fachgesellschaften AdWM. Nationale Versorgungsleitlinie Prävention und Therapie von Netzhautkomplikationen bei Diabetes www.netzhautkomplikationen.versorgungsleitlinien.de; 2015.
17. Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol*. 2003;75(1):95-108.
18. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol*. 2013;2013:343560-.
19. Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & vascular disease research*. 2013;10(6):472-82.
20. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
21. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Lett*. 2004;558(1-3):3-6.
22. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-75.
23. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158-67.
24. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
25. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771-8.
26. Watson JD. Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9919):841-3.
27. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014;30(2):271-81.
28. Cui Y, Xu X, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, et al. Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2006;83(4):807-16.
29. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(23):5839-48.
30. Brown OI, Bridge KI, Kearney MT. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Glucose Homeostasis and Diabetes-Related Endothelial Cell Dysfunction. *Cells*. 2021;10(9).
31. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(7):363-83.

32. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular research*. 2005;68(1):26-36.
33. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
34. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983-92.
35. Skulachev VP. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(2):283-9.
36. Kowluru RA. Diabetic Retinopathy and NADPH Oxidase-2: A Sweet Slippery Road. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(5).
37. Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, El-Remessy A, Bartoli M, et al. Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(7):3239-44.
38. Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids*. 2012;2012:736837-.
39. Wu M-Y, Yiang G-T, Lai T-T, Li C-J. The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:3420187-.
40. Dagher Z, Park YS, Asnaghi V, Hoehn T, Gerhardinger C, Lorenzi M. Studies of rat and human retinas predict a role for the polyol pathway in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004;53(9):2404-11.
41. Sjølie AK, Chaturvedi N. The retinal renin-angiotensin system: implications for therapy in diabetic retinopathy. *J Hum Hypertens*. 2002;16 Suppl 3:S42-S6.
42. Chu KY, Leung PS. Angiotensin II in type 2 diabetes mellitus. *Curr Protein Pept Sci*. 2009;10(1):75-84.
43. White AJ, Cheruvu SC, Sarris M, Liyanage SS, Lumbers E, Chui J, et al. Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015;16(1):59-66.
44. Hammes H-P. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia*. 2018;61(1):29-38.
45. Münch G, Thome J, Foley P, Schinzel R, Riederer P. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997;23(1-2):134-43.
46. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular research*. 1998;37(3):586-600.
47. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-46.

48. Veraldi N, Guerrini M, Urso E, Risi G, Bertini S, Bensi D, et al. Fine structural characterization of sulodexide. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;156:67-79.
49. Coccheri S, Mannello F. Development and use of sulodexide in vascular diseases: implications for treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2013;8:49-65.
50. Carroll BJ, Piazza G, Goldhaber SZ. Sulodexide in venous disease. *J Thromb Haemost.* 2019;17(1):31-8.
51. Silvestro L, Lanzarotti E, Marchi E, Gori M, Pescador R, Ferro L, et al. Human pharmacokinetics of glycosaminoglycans using deuterium-labeled and unlabeled substances: evidence for oral absorption. *Semin Thromb Hemost.* 1994;20(3):281-92.
52. Lauver DA, Booth EA, White AJ, Poradosu E, Lucchesi BR. Sulodexide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury and the deposition of C-reactive protein in areas of infarction without affecting hemostasis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2005;312(2):794-800.
53. Yin J, Chen W, Ma F, Lu Z, Wu R, Zhang G, et al. Sulodexide pretreatment attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Oncotarget.* 2017;8(6):9986-95.
54. Jiang Q-J, Bai J, Jin J, Shi J, Qu L. Sulodexide for Secondary Prevention of Recurrent Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in pharmacology.* 2018;9:876-.
55. Cosmi B, Cini M, Legnani C, Pancani C, Calanni F, Coccheri S. Additive thrombin inhibition by fast moving heparin and dermatan sulfate explains the anticoagulant effect of sulodexide, a natural mixture of glycosaminoglycans. *Thromb Res.* 2003;109(5-6):333-9.
56. Barbanti M, Guizzardi S, Calanni F, Marchi E, Babbini M. Antithrombotic and thrombolytic activity of sulodexide in rats. *Int J Clin Lab Res.* 1992;22(3):179-84.
57. Cerletti C, Rajtar G, Marchi E, de Gaetano G. Interaction between glycosaminoglycans, platelets, and leukocytes. *Semin Thromb Hemost.* 1994;20(3):245-53.
58. Dou H, Song A, Jia S, Zhang L. Heparinoids Danaparoid and Sulodexide as clinically used drugs. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2019;163:55-74.
59. Ligi D, Maniscalco R, Mannello F. New Frontiers for an Old Drug: What Is New on the Pleiotropic Effect of Sulodexide in Chronic Venous Disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020;75(3):208-10.
60. Mannello F, Ligi D, Canale M, Raffetto JD. Sulodexide down-regulates the release of cytokines, chemokines, and leukocyte colony stimulating factors from human macrophages: role of glycosaminoglycans in inflammatory pathways of chronic venous disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(1):173-85.
61. Ciszewicz M, Polubinska A, Antoniewicz A, Suminska-Jasinska K, Breborowicz A. Sulodexide suppresses inflammation in human endothelial cells and prevents glucose

cytotoxicity. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2009;153(3):118-23.

62. Dragomir E, Simionescu M. Monocyte chemoattractant protein-1--a major contributor to the inflammatory process associated with diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112(4-5):239-44.

63. Ciszewicz M, Polubinska A, Antoniewicz A, Suminska-Jasinska K, Breborowicz A. Sulodexide suppresses inflammation in human endothelial cells and prevents glucose cytotoxicity. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2009;153(3):118-23.

64. Hein TW, Rosa RH, Jr., Yuan Z, Roberts E, Kuo L. Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(3):1583-90.

65. 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. *Exp Eye Res*. 2014;127:1-8.

66. Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N. Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res*. 2013;109:60-6.

67. Potts LB, Bradley PD, Xu W, Kuo L, Hein TW. Role of endothelium in vasomotor responses to endothelin system and protein kinase C activation in porcine retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013;54(12):7587-94.

68. Dalsgaard T, Kroigaard C, Bek T, Simonsen U. Role of calcium-activated potassium channels with small conductance in bradykinin-induced vasodilation of porcine retinal arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(8):3819-25.

69. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

70. Benov L, Szejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(7):826-31.

71. Bukhari SM, Kiu KY, Thambiraja R, Sulong S, Rasool AH, Liza-Sharmini AT. Microvascular endothelial function and severity of primary open angle glaucoma. *Eye (London, England)*. 2016;30(12):1579-87.

72. Lim LS, Ling LH, Ong PG, Foulds W, Tai ES, Wong E, et al. Dynamic responses in retinal vessel caliber with flicker light stimulation in eyes with diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(8):5207-13.

73. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes*. 1993;42(1):80-9.

74. Nakazawa T, Kaneko Y, Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, et al. Attenuation of nitric oxide- and prostaglandin-independent vasodilation of retinal arterioles induced by acetylcholine in streptozotocin-treated rats. *Vascular pharmacology*. 2007;46(3):153-9.
75. Hein TW, Potts LB, Xu W, Yuen JZ, Kuo L. Temporal development of retinal arteriolar endothelial dysfunction in porcine type 1 diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(13):7943-9.
76. Hein TW, Xu W, Xu X, Kuo L. Acute and Chronic Hyperglycemia Elicit JIP1/JNK-Mediated Endothelial Vasodilator Dysfunction of Retinal Arterioles. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(10):4333-40.
77. Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, Dellett M, Archer DB, Cogliati T. Immunohistochemical study of pig retinal development. *Molecular vision*. 2009;15:1915-28.
78. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(4):475-82.
79. Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res*. 2017;139:7-14.
80. Guzman L, Balada C, Flores G, Alvarez R, Knox M, Vinet R, et al. t-Resveratrol Protects against Acute High Glucose Damage in Endothelial Cells. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*. 2018;73(3):235-40.
81. Giurdanella G, Lazzara F, Caporarello N, Lupo G, Anfuso CD, Eandi CM, et al. Sulodexide prevents activation of the PLA2/COX-2/VEGF inflammatory pathway in human retinal endothelial cells by blocking the effect of AGE/RAGE. *Biochem Pharmacol*. 2017;142:145-54.
82. Kristová V, Kriska M, Babál P, Djibril MN, Slámová J, Kurtansky A. Evaluation of endothelium-protective effects of drugs in experimental models of endothelial damage. *Physiological research*. 2000;49(1):123-8.
83. Kristova V, Liskova S, Sotnikova R, Vojtko R, Kurtansky A. Sulodexide improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Physiological research*. 2008;57(3):491-4.
84. Giurdanella G, Lazzara F, Caporarello N, Lupo G, Anfuso CD, Eandi CM, et al. Sulodexide prevents activation of the PLA2/COX-2/VEGF inflammatory pathway in human retinal endothelial cells by blocking the effect of AGE/RAGE. *Biochemical pharmacology*. 2017;142:145-54.
85. Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, Ishikawa Y, Yokoyama M. High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(1):122-8.

86. Zúrová-Nedelcevoová J, Navarová J, Drábiková K, Jancinová V, Petříková M, Bernátová I, et al. Participation of reactive oxygen species in diabetes-induced endothelial dysfunction. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006;27 Suppl 2:168-71.
87. Suminska-Jasinska K, Polubinska A, Ciszewicz M, Mikstacki A, Antoniewicz A, Breborowicz A. Sulodexide reduces senescence-related changes in human endothelial cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research.* 2011;17(4):Cr222-6.
88. Gabryel B, Jarzabek K, Machnik G, Adamczyk J, Belowski D, Obuchowicz E, et al. Superoxide dismutase 1 and glutathione peroxidase 1 are involved in the protective effect of sulodexide on vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation. *Microvasc Res.* 2016;103:26-35.
89. Borawski J, Dubowski M, Pawlak K, Mysliwiec M. Sulodexide induces hepatocyte growth factor release in humans. *Eur J Pharmacol.* 2007;558(1-3):167-71.
90. Condorelli M, Chiariello M, Dagianti A, Penco M, Dalla Volta S, Pengo V, et al. IPO-V2: a prospective, multicenter, randomized, comparative clinical investigation of the effects of sulodexide in preventing cardiovascular accidents in the first year after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23(1):27-34.
91. Gambaro G, Kinalska I, Oksa A, Pont'uch P, Hertlová M, Olsovsky J, et al. Oral sulodexide reduces albuminuria in microalbuminuric and macroalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients: the Di.N.A.S. randomized trial. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(6):1615-25.
92. Heerspink HL, Greene T, Lewis JB, Raz I, Rohde RD, Hunsicker LG, et al. Effects of sulodexide in patients with type 2 diabetes and persistent albuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(6):1946-54.
93. Song JH, Chin HS, Kwon OW, Lim SJ, Kim HK, Group DR. Effect of sulodexide in patients with non-proliferative diabetic retinopathy: diabetic retinopathy sulodexide study (DRESS). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253(6):829-37.
94. Conklin DJ, Guo Y, Jagatheesan G, Kilfoil PJ, Haberzettl P, Hill BG, et al. Genetic Deficiency of Glutathione S-Transferase P Increases Myocardial Sensitivity to Ischemia-Reperfusion Injury. *Circ Res.* 2015;117(5):437-49.
95. Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, Guida B, Damiano S. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. *Front Physiol.* 2015;6:194.
96. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
97. Deliyanti D, Alrashdi SF, Touyz RM, Kennedy CR, Jha JC, Cooper ME, et al. Nox (NADPH Oxidase) 1, Nox4, and Nox5 Promote Vascular Permeability and Neovascularization in Retinopathy. *Hypertension.* 2020:Hypertensionaha11914100.

98. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S227-32.
99. Zadeh JK, Garcia-Bardon A, Hartmann EK, Pfeiffer N, Omran W, Ludwig M, et al. Short-Time Ocular Ischemia Induces Vascular Endothelial Dysfunction and Ganglion Cell Loss in the Pig Retina. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
100. Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, Matragoon S, Behzadian MA, et al. Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *Am J Pathol.* 2005;167(2):599-607.
101. Kowluru RA, Kowluru A, Veluthakal R, Mohammad G, Syed I, Santos JM, et al. TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2014;57(5):1047-56.
102. Li J, Wang JJ, Yu Q, Chen K, Mahadev K, Zhang SX. Inhibition of reactive oxygen species by Lovastatin downregulates vascular endothelial growth factor expression and ameliorates blood-retinal barrier breakdown in db/db mice: role of NADPH oxidase 4. *Diabetes.* 2010;59(6):1528-38.
103. 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. *Molecular vision.* 2014;20:231-41.
104. Meng W, Shah KP, Pollack S, Toppila I, Hebert HL, McCarthy MI, et al. A genome-wide association study suggests new evidence for an association of the NADPH Oxidase 4 (NOX4) gene with severe diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol.* 2018;96(7):e811-e9.
105. Gorin Y, Block K. Nox4 and diabetic nephropathy: with a friend like this, who needs enemies? *Free Radic Biol Med.* 2013;61:130-42.
106. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, et al. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia.* 2003;46(10):1428-37.
107. Jha JC, Dai A, Holterman CE, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR, et al. Endothelial or vascular smooth muscle cell-specific expression of human NOX5 exacerbates renal inflammation, fibrosis and albuminuria in the Akita mouse. *Diabetologia.* 2019;62(9):1712-26.
108. Holterman CE, Boisvert NC, Thibodeau JF, Kamto E, Novakovic M, Abd-Elrahman KS, et al. Podocyte NADPH Oxidase 5 Promotes Renal Inflammation Regulated by the Toll-Like Receptor Pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(15):1817-30.

109. Rojas M, Zhang W, Xu Z, Lemtalsi T, Chandler P, Toque HA, et al. Requirement of NOX2 expression in both retina and bone marrow for diabetes-induced retinal vascular injury. *PloS one*. 2013;8(12):e84357.
110. Turgut F, Bolton WK. Potential new therapeutic agents for diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2010;55(5):928-40.
111. Appukuttan B, Ma Y, Stempel A, Ashander LM, Deliyanti D, Wilkinson-Berka JL, et al. Effect of NADPH oxidase 1 and 4 blockade in activated human retinal endothelial cells. *Clin Exp Ophthalmol*. 2018;46(6):652-60.
112. Zadeh JK, Ruemmler R, Hartmann EK, Ziebart A, Ludwig M, Patzak A, et al. Responses of retinal arterioles and ciliary arteries in pigs with acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Exp Eye Res*. 2019;184:152-61.
113. Zadeh JK, Zhutdieva MB, Laspas P, Yuksel C, Musayeva A, Pfeiffer N, et al. Apolipoprotein E Deficiency Causes Endothelial Dysfunction in the Mouse Retina. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:5181429.
114. Manea SA, Constantin A, Manda G, Sasson S, Manea A. Regulation of Nox enzymes expression in vascular pathophysiology: Focusing on transcription factors and epigenetic mechanisms. *Redox Biol*. 2015;5:358-66.
115. Fu Y, Zhang Y, Wang Z, Wang L, Wei X, Zhang B, et al. Regulation of NADPH oxidase activity is associated with miRNA-25-mediated NOX4 expression in experimental diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2010;32(6):581-9.
116. Rastogi R, Geng X, Li F, Ding Y. NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:301.
117. Liu H, Yu S, Xu W, Xu J. Enhancement of 26S proteasome functionality connects oxidative stress and vascular endothelial inflammatory response in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(9):2131-40.
118. Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2013;63:207-21.
119. Gonzalez-Ochoa AJ, Raffetto JD, Hernández AG, Zavala N, Gutiérrez O, Vargas A, et al. Sulodexide in the Treatment of Patients with Early Stages of COVID-19: A Randomized Controlled Trial. *Thromb Haemost*. 2021;121(7):944-54.
120. Moran EP, Wang Z, Chen J, Sapienza P, Smith LE, Ma JX. Neurovascular cross talk in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and therapeutic implications. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2016;311(3):H738-49.