

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

Einfluss einer Hypercholesterinämie auf die Endothelfunktion der Arteria ophthalmica

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

Vorgelegt von

Francesco Buonfiglio
aus Neapel, Italien

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 11. Oktober 2023

Meiner Mutter
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Einleitung und Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion.....	2
2.1 Arteria ophthalmica und okuläre Perfusion.....	2
2.2 Oxidativer Stress und endotheliale Funktion	4
2.2.1 Oxidativer Metabolismus und mitochondriale Elektronentransportkette	4
2.2.2 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und reaktiven Stickstoffspezies.....	5
2.2.3 Prooxidative und antioxidative Enzyme	6
2.2.4 Einfluss von reaktiven Spezies auf das Endothel.....	8
2.3 Bedeutung von Apolipoprotein E und LDL.....	9
2.4 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bei Hypercholesterinämie	12
2.4.1 Der LOX-1 Rezeptor und seine Signalwege	12
2.4.2 Primäre Hypercholesterinämie Vs. Metabolisches Syndrom.....	14
2.5 Zentrale Hypothesen.....	16
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Tiermodell.....	17
3.2 Vorbereitung der Gefäßstudien	18
3.2.1 Präparation der Arterien und Vorbereitung auf das Experiment	18
3.2.2 Integritätsprüfung der Arterien	18
3.3 Durchführung der Gefäßstudien.....	19
3.3.1 Funktionelle Studien gegenüber Phenylephrin, Nitroprussid, Acetylcholin	19
3.3.2 Inkubation mit NOS- und COX-Inhibitoren	19
3.3.3 Testung der EDHF-abhängigen Vasodilatation.....	20
3.3.4 Testung der mechanischen Eigenschaften der Arteria ophthalmica.....	20
3.4 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium (DHE)	22
3.5 Nachweis der Genexpression von Redoxgenen mittels quantitativer PCR	23
3.6 Nachweis des Expressionsniveaus von Redoxgenen auf Proteinebene.....	24
3.7 Statistische Auswertung.....	25
4. Ergebnisse	26
4.1 Gefäßreaktivität in der Aorta	26
4.2 Gefäßreaktivität in der Arteria ophthalmica	27
4.3 Mechanische Eigenschaften der Arteria ophthalmica	31
4.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies	32
4.5 Quantifizierung der Expression von Redoxenzymen	33
4.6 Quantifizierung der Expression von LOX1-Rezeptor	36

5. Diskussion.....	37
5.1 Zentrale neue Erkenntnisse der Studie	37
5.2 Vergleich eigener Ergebnisse mit dem aktuellen Forschungsstand.....	38
5.2.1 Literaturstand über den Einfluss von oxLDLs auf das Endothel	38
5.2.2 Endotheliale Signalmechanismen in der Arteria ophthalmica.....	40
5.2.3 NOX1, NOX2 und NOX4 lösen unterschiedliche Effekte in der Aorta aus.....	43
5.3 Schlussfolgerung	46
6. Zusammenfassung.....	48
7. Literaturverzeichnis	X
8. Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9. Tabellarischer Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

12-HETE	12-Hydroxyeicosatetraenoic Säure (engl. 12-hydroxyeicosatetraenoic acid)
12/15 LOX	12/15 Lipoxigenase
AGEs	Glykierte Reaktionsprodukte (engl. advanced glycation endproducts)
ApoE	Apolipoprotein E
ARDS	akutes Atemnotsyndrom (engl. acute respiratory distress syndrome)
ATP	Adenosintriphosphat
CAT	Katalase (engl. catalase)
Casp	Caspase
COX	Zyklooxygenase (engl. cyclooxygenase)
DHE	Dihydroethidium
DUOX	Dualoxidase (engl. dual oxidase)
EDHF	Endothelabhängiger Hyperpolarisationsfaktor (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factor)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor)
ETC	Elektronentransportkette (engl. electron transport Chain)
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form
GPX	Glutathionperoxidase
HDL	Lipoproteine hoher Dichte (engl. high density lipoprotein)
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-Alpha (engl. Hypoxia-inducible Factor-1 α)
HO	Hämoxygenase
IDL	Lipoproteine mit mittlerer Dichte (engl. intermediate density lipoprotein)
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (engl. insulin-like growth factor 1)
JNK	Janus-Kinase
LDL	Lipoproteine niedriger Dichte (engl. low density lipoprotein)
LDLc	Lipoproteine niedriger Dichte-Cholesterin
LOX	Lektinähnlicher oxidatives Lipoprotein niedriger Dichte (engl. lectin-like oxidized low-density lipoprotein)
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat in reduzierter Form
NF-kB	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphocyten bindet (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (engl. nitric oxide synthase)
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
NOX	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase)
OIS	Okuläre Ischämischesyndrom (engl. okular ischemic syndrom)
Ox-LDL	Oxidatives LDL

PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (engl. platelet-derived growth factor)
PKC	Protein Kinase C
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. real time-PCR)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RAGE	Rezeptor für AGEs
RCT	Reverser Transport des Cholesterins (engl. reverse cholesterol transport)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RNS	Reaktive Nitrogenspezies (engl. reactive nitrogen species)
SOD	Superoxid-Dismutase
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor Beta (engl. transforming growth factor beta)
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha (engl. Tumornecrosis Factor alpha)
VEGF-A	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (engl. vascular endothelial growth factor A)
VLDL	Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte (engl. very low density lipoprotein)
VSMC	vaskuläre Proliferation von glatten Muskelzellen aktiviert (engl. vascular smooth muscle cell)
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** 3D-Darstellung der Arteria ophthalmica und einige ihrer Äste, in ihrem lateralen Verlauf. Einige Äste, werden im Bild nicht dargestellt: Arteriae ciliares posteriores, Arteria supraorbitalis, Arteriae etmoidales posterior, Arteria dorsalis nasi, Arteria palpebralis medialis (Bild erstellt durch die 3D-Graphikvorlage von Microsoft Office 2019).2
- Abbildung 2:** Darstellung der chemischen Reaktion zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies nach (27,41). O_2 : Sauerstoff; $^1\Delta g$: Singulett-Sauerstoff; $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; $HO\cdot$: Hydroxyl Radikal; $HO_2\cdot$: Hydroperoxyl-Radikal; OH^- : Hydroxylion; H_2O : Wasser; e^- : Elektron; H^+ : Proton.5
- Abbildung 3:** Darstellung der chemischen Reaktion zur Entstehung von reaktiven Sticksstoffspezies nach (42). $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; $NO\cdot$: Stickstoffmonoxid; $ONOO^-$: Peroxynitrit-Anion; $ONOOH$: Peroxynitrosäure; ; H^+ : Proton.5
- Abbildung 4:** Darstellung der Dismutation vom Superoxid-Anionradikal in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, durch die enzymatische Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) nach (59). $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; H^+ : Proton; O_2 : Sauerstoff; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid.....7
- Abbildung 5:** Überblick der Reaktionen nach (44), die durch NOX und eNOS zur endothelialen Dysfunktion führen. $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; $NO\cdot$: Stickstoffmonoxid; $ONOO^-$: Peroxynitrit-Anion; O_2 : Sauerstoff; BH_4 : (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin; $BH_3\cdot$: Trihydrobiopterin-Radikal; BH_2 : 6,7-[8H]-Dihydrobiopterin; NOX: NADPH-Oxydase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase.8
- Abbildung 6:** Extrazelluläre Darstellung der Entstehung von oxidativen LDLs durch den MPO-Mechanismus nach (47). Aktivierte Phagozyten sezernieren MPOs und diese katalysieren die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxiden (H_2O_2) und Chlorid (Cl^-), mit der folgenden Entstehung von Hypochlorsäure (HOCl). Diese reagiert direkt mit den LDLs und generiert OxLDLs. MPO: Myeloperoxidase. NADPH-Oxydase (NOX): Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxydase.10
- Abbildung 7:** Extrazelluläre Darstellung der Entstehung von oxidativen LDLs durch den RNS-Mechanismus nach (47). Aktivierte Phagozyten sezernieren MPOs und parallel durch iNOS (induzierte Stickstoffmonoxidsynthase) generieren Stickstoffmonoxide ($NO\cdot$). Diese wird auch vom Endothel durch eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase) produziert. Stickstoffmonoxide reagiert sowohl mit Superperoxide ($O_2^{\cdot-}$) und generiert Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$), als auch mit Sauerstoff mit der Entstehung von Nitriten (NO_2^-). Diese reagieren mit MPO (Myeloperoxidase) und produzieren Stickstoffdioxid ($NO_2\cdot$). Peroxynitrit-Anion und Stickstoffdioxid reagieren direkt mit den LDLs und generieren OxLDLs.....11
- Abbildung 8:** Darstellung der molekularen Struktur des Rezeptors LOX-1 nach (93).12
- Abbildung 9:** Darstellung einer Bindung zwischen Ox-LDL und LOX-1 Rezeptoren nach (91,92,94).....13
- Abbildung 10:** Überblick der intrazellulären Kaskade auf Endothelebene bei primärer Hypercholesterinämie. Insbesondere relevant für die ROS-Entstehung ist die Aktivität der NADPH-Oxidase 2. Die ROS-Entstehung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie zur Beeinträchtigung der Funktion der eNOS und der 12/15 Lipoxigenase (12/15 LOX), sodass eine Inflammation, eine endotheliale Dysfunktion und eine Hochregulation des LOX-1-Rezeptors ausgelöst werden.14
- Abbildung 11:** Überblick der intrazellulären Kaskade auf Endothelebene bei metabolischem Syndrom. Hierbei besteht zusätzlich mit Hypercholesterinämie auch Hyperglykämie, mit folgender verstärkter ROS-Entstehung und darauffolgend größerer Gewebebeschädigungen durch die Aktivierung weiterer diverser Signalwege.....15
- Abbildung 12 A-B-C:** Gefäßreaktivität der Aorta bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber dem Vasokonstriktor Phenylephrin (A), dem endothelunabhängigen Vasodilatator

Nitroprussid (B) und dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (C). Die Gefäßantwort der Aorta gegenüber Acetylcholin war bei ApoE^{-/-} Mäusen reduziert. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Genotyp; **P < 0.01).26

Abbildung 13 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Phenylephrin (A), Nitroprussid (B), und gegenüber Acetylcholin (C) zeigt keinen Unterschied bei beiden Maus-Genotypen. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Genotyp).27

Abbildung 14 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) L-NAME (nicht-isoform-selektiver NOS Blocker), (B) TRIM (selektiver nNOS Inhibitor), und (C) Aminoguanidin (selektiver iNOS Blocker). Unter diesen drei NOS-Inhibitoren blockierte nur L-NAME die cholinerge Gefäßantwort bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen deutlich. Dies ist bezeichnend für eine Beteiligung von eNOS an der endothelabhängigen Vasodilatation. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Gruppe).28

Abbildung 15 A-B-C: Die Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) Indometazin (nicht-isoform-selektiver COX-1- und COX-2-Inhibitor) zeigt keine Wirkung auf die cholinerge Vasodilatation, während die Kombination von L-NAME and Indometazin (B) vasodilatatorische Reaktionen in ähnlichem Ausmaß blockierte wie durch L-NAME allein. Der Restanteil der vasodilatatorischen Reaktivität in inkubierten Arteriensegmenten mit L-NAME und Indometazin war nach Zugabe von 30 mM KCl (C) fast vollständig aufgehoben, was für eine EDHF-Beteiligung spricht. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Gruppe; ### P<0.001, behandelte ApoE^{-/-} versus nicht-behandelte; *** P<0.001, behandelte Wildtyp-Mäuse versus nicht-behandelte).29

Abbildung 16 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-} und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) Indometazin, L-NAME und 17-ODYA, mit (B) Indometazin, L-NAME und Baicalein, und mit (C) Indometazin, L-NAME und 18α-GA. Eine Blockade der Signalwege von CYP450- und von 12/15-Lipoxygenase mit 17-ODYA und Baicalein, sowie Blockade der Gap-Junktions mit 18α-GA, reduzierte vasodilatatorische Antworten in ähnlichem Ausmaß wie bei inkubierten Arteriensegmenten mit L-NAME und Indometazin, bei beiden Mausgenotypen, was ein Anzeichen für eine Beteiligung dieser Signalwege an der Vasodilatation ist. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Gruppe; ### P<0.001, behandelte ApoE^{-/-} versus nicht-behandelte; *** P<0.001, behandelte Wildtyp-Mäuse versus nicht-behandelte).30

Abbildung 17 A-B-C: Bestimmung der Verhältnisse von Innen (μm)- (A) und Außendurchmesser (μm) (B) zum luminalen Druck (mmHg), sowie des Spannungs (in ×10⁻⁵ N-m²) -Dehnungs (in ΔD-D₀) -Verhaltens (C) in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. Die maximale Gefäßrelaxation der Arteria ophthalmica wurde durch EDTA erzielt, indem die glatte Muskelschicht inaktiviert wurde, um eine Gefäßumwand zu prüfen. Es wurden keine Differenzen in Innen- und Außendurchmesser zum luminalen Druck festgestellt, sowie keine Unterschiede in Spannungs-Dehnungs-Verhalten der Gefäße gezeigt. Daher kein Zeichen von Gefäßumwand in folgend der Hypercholesterinämie bei ApoE^{-/-} Mäusen konnte nachgewiesen werden.31

Abbildung 18 A-B: Die DHE-Färbungsintensität (rot) war deutlich erhöht in der Gefäßwand der Aorta (A), jedoch nicht in der Arteria ophthalmica (B). Es wird für jedes Gefäßbett und Mausgenotyp eine repräsentative Fotografie dargestellt, als zusammengefügtes Bild der DHE-Färbung und der Autofluoreszenz der Lamina elastica (grün), um die Lokalisierung der Zellen einschließlich der Gefäßwand zu visualisieren. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8 pro Konzentration und Genotyp; **P<0.01, ApoE^{-/-} versus Wildtyp-Mäuse). Maßstabsleiste = 20 μm.32

Abbildung 19 A-B: Boten-RNA (mRNA) Expression für prooxidative Redoxenzymen NOX1, NOX2, NOX4 und XO in der Aorta (A) und in der Arteria ophthalmica (B) als Fold-change

(Mittelwert \pm SE) bei ApoE^{-/-}-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse angegeben (bei der Aorta, n=8 und bei der Arteria ophthalmica n=6; ***P < 0.001, ApoE^{-/-} versus Wildtyp-Mäuse).33

Abbildung 20 A-B-C-D-E-F-G-H: Darstellung der Expression von Redoxenzymen NOX-1, NOX-2, NOX-4, XO auf Proteinebene mittels Immunofärbungen bei der Aorta abdominalis und bei der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen. Es wurden ausgeprägten Expressionen von NOX1 und NOX2 im Endothel der Aorta bei ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen, wobei die NOX4 Expression nicht im Endothel sondern in der glatten Muskelschicht erhöht war. Zwischen der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen wurden jedoch keine deutlichen Differenzen bei der Expression von prooxidativen Enzymen beobachtet. Blau: DAPI ; Rot: Rhodamin Red-X-Färbung. Maßstabsleiste = 20 μ m.35

Abbildung 21 A-B: Darstellung der Expression von Redoxenzymen LOX-1 Rezeptor auf Proteinebene mittels Immunfärbungen in der Aorta abdominalis und in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen. Die weißen Pfeile deuten auf die Endothelzellenschicht. In der Aorta (A) war besonders erhöht die Expression von LOX-1 Rezeptor im Endothel und in der glatten Muskulatur, während in der Arteria ophthalmica (B) war seine Expression sowohl im Endothel als auch in der glatten Muskulatur sehr gering. Blau: DAPI ; Rot: Rhodamin Red-X-Färbung. Maßstabsleiste = 20 μ m.36

Abbildung 22: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene in retinalen Arteriolen der ApoE^{-/-}-Maus, durch eine Aktivierung des LOX-1 Rezeptors aufgrund erhöhter oxLDL-Level bei Hypercholesterinämie. Durch die LOX-1-induzierte Kaskade wird die NADPH-Oxydase 2 (NOX2) aktiviert und darauffolgend entsteht die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Daraufhin lösen ROS die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B aus, der induziert die mRNA LOX-1 Hochregulation und die Immunantwort durch Zytokine wie HIF-1 α und VEGF-A. Zudem wird durch die ROS-Entstehung die eNOS- und 12/15 Lipoxigenase-Funktion beeinträchtigt: insbesondere bei eNOS findet eine sogenannte „Entkopplung“ statt, indem dieses Enzym in Gegenwart von ROS, nicht mehr mit Tetrahydrobiopterin (BH₄), sondern mit BH₂ (7,8-dihydrobiopterin) assoziiert ist, sodass statt Stickstoffmonoxide (NO) eine radikale Sauerstoffspezies wie Peroxynitrit-Anion (OONO⁻) produziert wird.38

Abbildung 23: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene in der Arteria ophthalmica der ApoE^{-/-}-Maus. Interessanterweise konnten in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen keine Überexpression der LOX-1 im Vergleich zu Wildtypkontrollen sowie keine verstärkte ROS-Produktion nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden ROS-Entstehung werden die endothelabhängigen vasodilatatorischen Mechanismen nicht beeinträchtigt, so dass keine endotheliale Dysfunktion induziert wird.40

Abbildung 24: Vergleich der unterschiedlichen Auswirkungen einer Hypercholesterinämie zwischen retinalen Arteriolen und Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}-Mäusen, sowie einer arteriellen Hypertonie bei Mäusen, in welchen durch eine Verabreichung von Angiotensin II, eine Hypertension ausgelöst wurde. Interessanterweise war aufgrund einer Hypercholesterinämie in der Arteria ophthalmica keine endotheliale Dysfunktion nachzuweisen, während bei Hypertonie, durch den AT1-Rezeptor und folgende Aktivierung von NOX-2, konnte eine endotheliale Dysfunktion festgestellt werden.42

Abbildung 25: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene und auf Glattmuskelebene in der Aorta abdominalis der ApoE^{-/-}-Maus. Bemerkenswerterweise war die erhöhte Expression von NOX1 und NOX2 entscheidend für die ROS-Entstehung auf Endothelebene und verantwortlich für die endotheliale Dysfunktion, jedoch nicht im Gefäßmuskel; hier war dagegen die Erhöhung der Expression und der Aktivität von NOX4 nachzuweisen, während das Expressionsniveau von NOX1 und NOX2 nicht erhöht war. Wahrscheinlich ist NOX4 verantwortlich für die Bildung subendothelialer atherosklerotischer Plaques bei glatten Muskelzellen.43

Abbildung 26: Darstellung der Gefäßwand in der menschlichen Aorta abdominalis nach (148). Bemerkenswerterweise zählt das Endothel für wenig mehr als ein Zehnte der gesamten Gefäßwand der Aorta, während die Hälfte ist durch die glatte Muskelschicht repräsentiert, und die Tunica adventitia mit ihren Nerven und Vasa Vasorum nimmt zirka ein Drittel der Gefäßwand ein.....44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick der Isoformen von prooxidativen und antioxidativen Enzymen	6
Tabelle 2: Klassifikation von Hypercholesterinämie nach (83)	10
Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen für die qPCR-Methode (V: vorwärts, R: rückwärts)	23
Tabelle 4: Übersichtstabelle unserer Ergebnisse und Vergleich zwischen Verhältnisse der Arteria ophthalmica und der Aorta abdominalis	47

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Hypercholesterinämie ist ein Hauptrisikofaktor für Atherosklerose und diverse kardiovaskuläre Erkrankungen (1-4). Im Spektrum der Augenerkrankungen ist die Hypercholesterinämie mit retinalen Arterienverschlüssen and Venenverschlüssen in Verbindung gebracht worden (5-7). Außerdem korrelieren erhöhte Serumcholesterinspiegel beim Menschen mit einer reduzierten, vermutlich endothelvermittelten, hyperämischen Reaktion retinaler Blutgefäße gegenüber Flickerlichtstimulation (8, 9). Trotz dieser Erkenntnisse sind die Auswirkungen der Hypercholesterinämie auf vaskuläre Signalwege am Auge nur unzureichend untersucht. Studien in verschiedenen Gefäßgebieten ergaben, dass Hypercholesterinämie-induzierte Gefäßschäden mit oxidativen Veränderungen von Lipoproteinen und Phospholipiden, einer Aktivierung von Endothelzellen und einer Infiltration der Gefäßwand durch Makrophagen unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffverbindungen (*engl.* reactive oxygen species, ROS) einhergehen (10). Mehrere Enzyme können in der Gefäßwand als ROS-Quelle dienen, einschließlich der reduzierten Form der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)Oxidase (NOX), der Xanthinoxidase (XO), der mitochondrialen Elektronentransportkette und einer dysfunktionalen endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (10-12).

Das Hauptziel dieser Promotionsarbeit ist, die Hypothese zu prüfen, dass eine chronische Hypercholesterinämie eine endotheliale Dysfunktion in der Arteria ophthalmica hervorruft, dem ersten Abgang der Arteria carotis interna, der nahezu das gesamte Auge und andere orbitale Strukturen mit Blut versorgt. Ein anderes Ziel dieser Arbeit ist, zu testen, ob intrazelluläre Signalwege, die an der Vasodilatation beteiligt sind, von der Hypercholesterinämie beeinträchtigt werden. In der vorliegenden Studie verwendeten wir Mäuse, denen das Gen für das Apolipoprotein E fehlt (ApoE^{-/-}), ein etabliertes Tiermodell, das eine schwere spontane Hypercholesterinämie und atherosklerotische Schäden in verschieden Blutgefäßen, einschließlich der Aorta, auslöst, ähnlich wie sie auch beim Menschen zu finden sind (13-15).

2. Literaturdiskussion

2.1 Arteria ophthalmica und okuläre Perfusion

Die Arteria ophthalmica ist der erste und größte Ast der Arteria Carotis interna (16, 17). Sie entspringt aus dem anteromedialen oder superomedialen Teil der Arteria Carotis interna und ist an der Perfusion der Orbita, einschließlich des Auges, beteiligt (16). Sie verläuft kaudal und lateral des Nervus opticus durch den Canalis opticus in die Orbita (18) und teilt sich auf in okuläre und orbitale Äste (17). Zu den okulären Ästen gehören die Arteria centralis retinae und die Arteriae ciliares posteriores (longae und breves), die die Retina und den Nervus opticus mit Blut versorgen. Zu den orbitalen Ästen gehören die Arteria lacrimalis, die Arteriae etmoidales posterior und anterior, die Arteria supraorbitalis, die Arteria palpebralis medialis, die Arteria dorsalis nasi, die Arteria supratrochlearis und die Rami musculares (Arteriae ciliares anterior), die an der Perfusion der extraokularen Muskulatur, der Tränendrüsen und der Augenlider beteiligt sind (17).

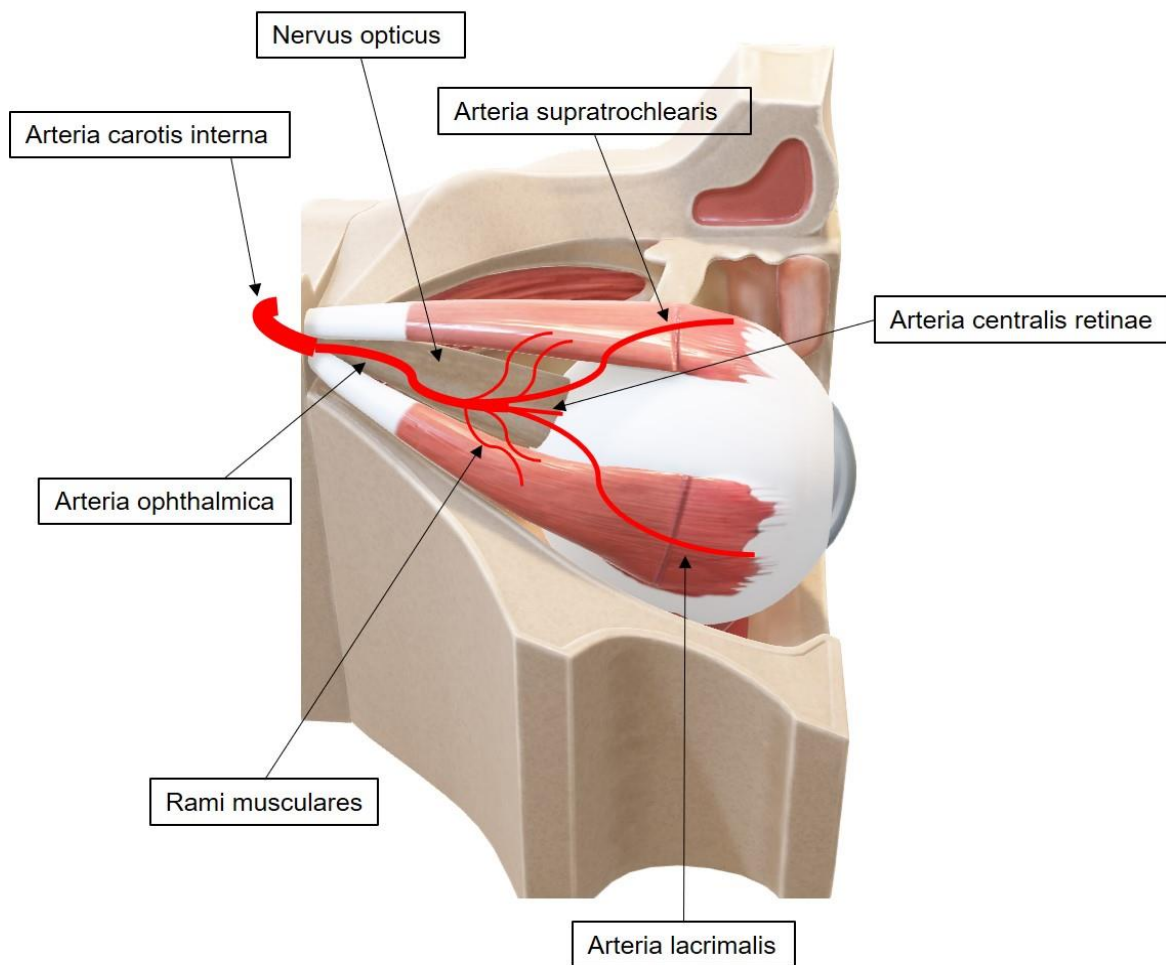


Abbildung 1: 3D-Darstellung der Arteria ophthalmica und einige ihrer Äste, in ihrem lateralen Verlauf. Einige Äste, werden im Bild nicht dargestellt: Arteriae ciliares posteriores, Arteria supraorbitalis, Arteriae etmoidales posterior, Arteria dorsalis nasi, Arteria palpebralis medialis (Bild erstellt durch die 3D-Graphikvorlage von Microsoft Office 2019).

Die Arteria ophthalmica ist in ihrer Größe und Konfiguration sehr variabel (16, 19). Aufgrund ihrer Tortuosität und ihres variablen Verlaufs sind Blutflussmessungen in der A. ophthalmica in vivo mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet (19). Jedoch wird beschrieben, dass Messungen bei größeren Gefäßen, wie der A. ophthalmica, mit höherer Genauigkeit durchgeführt werden können, als bei kleineren Gefäßen (19).

Die A. ophthalmica ist von zentraler Bedeutung bei der Pathogenese ischämischer Augenerkrankungen, wie dem okulären Ischämiesyndrom (*engl.* ocular ischemic syndrome, OIS), wobei eine Okklusion oder Stenose der A. carotis interna besteht und darüber hinaus eine Blockade der Perfusion durch die A. ophthalmica auftritt (20). Besonders bei älteren Personen können arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie als Auslöser einer Stenose wirken. Sie kann aber auch infolge von Verletzungen oder als Teil des Krankheitsbildes von Morbus Horton auftreten (20).

Zustände wie Diabetes mellitus und Glaukom können eine Störung des Blutflusses im Auge verursachen (21-24), die zu erheblichen Sehproblemen bis hin zur Blindheit führen können (23). Bei anhaltend hohen Blutzuckerwerten ohne diabetische Retinopathie lässt sich zunächst eine Minderung der okulären Blutzirkulation beobachten (25, 26). Mit fortschreitendem Diabetes mellitus kommt es aufgrund von Gewebshypoxie und abnormer vaskulärer Selbstregulation zu Veränderungen in der Durchblutung der Netzhaut, was zur Entwicklung einer proliferativen diabetischen Retinopathie beiträgt (21).

Beim primärem Offenwinkelglaukom wurde gezeigt (22), dass reduzierte okuläre Perfusionsdrücke mit einer Zunahme von glaukomatösen Schaden des Sehnervs korrelieren (23, 24).

Beim Neovaskularisationsglaukom besteht ebenfalls eine Störung der okulären Zirkulation. Dies bezieht sich auf eine sekundäre Art von Glaukom (30), das durch umfangreiche Neubildung von Blutgefäßen an der Iris und Fibrose im Kammerwinkel charakterisiert ist. Die Krankheit wird durch retinale Ischämie ausgelöst, die entweder im Kontext eines okulären Ischämie-Syndroms oder einer diabetischen Retinopathie eintritt (25).

2.2 Oxidativer Stress und endotheliale Funktion

2.2.1 Oxidativer Metabolismus und mitochondriale Elektronentransportkette

Oxidativer Stress wird als Ungleichgewicht zwischen oxidierenden und antioxidativen Molekülen, zugunsten von oxidierenden Spezies, definiert, die potenziell zu zellulären Schäden führen können (26). Die oxidativen Schäden umfassen Lipid-Peroxidation, DNA- sowie Protein-Läsionen (27, 28), die eine Apoptose, Pyroptose bei Diabetes Mellitus (29), Dysfunktion und Nekrose hervorrufen (28). Aus pathogenetischer Sicht werden weit verbreitete Krankheiten immer häufiger mit oxidativem Stress assoziiert, darunter Tumore, Neurodegeneration, Atherosklerose, Diabetes mellitus, okuläre degenerative Erkrankungen, rheumatisch-immune Erkrankungen, sowie Entzündungen (30). In dieser Konstellation zählt das Auge zu den sehr sensiblen Organen, da dieses, aufgrund seiner Funktion, besonders hohe Mengen an UV-Strahlung absorbiert, was insbesondere in der Hornhaut und der Retina zu photo-oxidativem Stress mit erheblicher Produktion oxidierender Sauerstoffspezies führt (31).

Oxidativer Metabolismus ist ein physiologischer Prozess, bei dem im Rahmen verschiedener biochemischer Reaktionen unseres Körpers ROS und andere oxidierende Moleküle (32) produziert werden, die in dosierter Quantität essentiell für die intrazelluläre Homöostase sind (33). Oxidativer Stress entsteht nur, wenn ein vermindertes Niveau an antioxidativen Molekülen oder eine Überproduktion von reaktiven Spezies besteht, sodass antioxidativen Systeme scheitern, freie Radikale zu neutralisieren (30, 34, 35).

Es gibt diverse exogene Faktoren, die die Bilanz zwischen oxidierenden und antioxidativen Molekülen in den Zellen beeinflussen können und zur Steigerung der ROS-Produktion führen. Zu denen zählen Infektionen, Entzündungen, Hypoxie, Exposition gegenüber Toxinen, Rauchen, Alkohol, einige Drogen, sowie UV-Strahlung (36). Oxidierende Reaktionen erfolgen auch unter physiologischen Umständen in Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen (27). Insbesondere in der Elektronentransportkette (*engl.* electron transport chain, ETC) der Mitochondrien finden zahlreiche oxidative Prozesse statt, die besonders relevant für die Homöostase der Zellen sind, da diese zur Entstehung von Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser (H_2O), als Endprodukte der Kette, führen (27).

2.2.2 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und reaktiven Stickstoffspezies

Die Elektronentransportkette ist die endogene Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies. Hierbei führen Elektronenlecks entlang der Kette durch zügige Reaktion mit Sauerstoff zur Entstehung von Superoxid-Anionradikalen ($O_2^{\cdot-}$), die wiederum zur Bildung anderer reaktiver Sauerstoffverbindungen, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl Radikal ($HO\cdot$), führt (37-40).

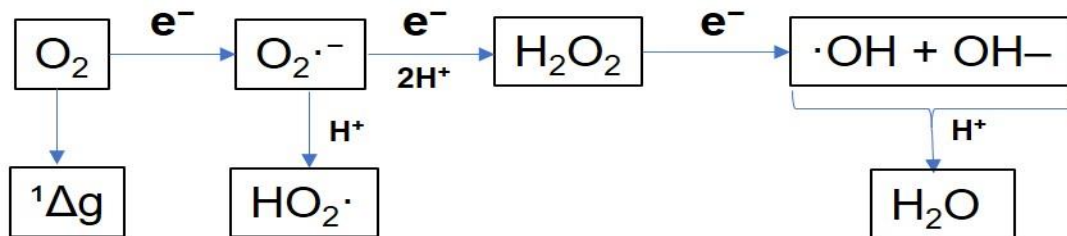


Abbildung 2: Darstellung der chemischen Reaktion zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies nach (27,41). O_2 : Sauerstoff; ${}^1\Delta g$: Singulett-Sauerstoff; $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; $HO\cdot$: Hydroxyl Radikal; $HO_2\cdot$: Hydroperoxyl-Radikal; OH^- : Hydroxylion; H_2O : Wasser; e^- : Elektron; H^+ : Proton.

Das Superoxid-Anionradikal sowie Hydroxyl Radikal, Hydroperoxyl ($HOO\cdot$), Peroxyl ($ROO\cdot$) und Alkoxy ($RO\cdot$), zählen zu den freien Radikalen (27), da diese über mindestens ein ungepaartes Valenzelektron verfügen (41). Demgegenüber sind Wasserstoffperoxid, Hypochlorsäure ($HOCl$), Ozon (O_3) und Singulett-Sauerstoff (${}^1\Delta g$) sogenannte „nicht-radikal oxidierende chemische Spezies“ (27, 41), da sie über Elektronenpaare in kovalenten Bindungen verfügen (41).

Zusammen mit den reaktiven Sauerstoffspezies gehören reaktiven Stickstoffspezies (*engl.* reactive nitrogen species, RNS) zu den schädlichsten oxidierenden Molekülen in Zellen und Geweben (28). RNS wie das Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$) entstehen aus Reaktionen zwischen Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) und Superoxid-Anionradikalen (42). $NO\cdot$ wird als diffusionsfähiges freies Radikal definiert (43), und auch als kleinstes bekanntes Signal-Molekül (44). Es wird unter physiologischen Umständen aus enzymatischen Aktivitäten durch Stickstoffmonoxid-Synthase (*engl.* nitric oxyd synthase, NOS) generiert und spielt eine Hauptrolle bei der Regulation der Vasodilatation (43). Die Reaktion zwischen Stickstoffmonoxid und Superoxid-Anionradikalen läuft sehr zügig ab und kann deswegen der Kontrolle durch die Superoxid-Dismutase (SOD), einem anti-oxidativen Enzym, entkommen (45, 46). Andere RNS wie Nitrite (NO_2^-) und Stickstoffdioxid ($NO_2\cdot$) entstehen in Gegenwart anderer Enzyme, wie zum Beispiel der Myeloperoxidase (MPO) und sind unter anderem bei der Entstehung von oxidierten LDLs von Bedeutung (47).



Abbildung 3: Darstellung der chemischen Reaktion zur Entstehung von reaktiven Stickstoffspezies nach (42). $O_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; $NO\cdot$: Stickstoffmonoxid; $ONOO^-$: Peroxynitrit-Anion; $ONOOH$: Peroxynitrosäure; H^+ : Proton.

2.2.3 Prooxidative und antioxidative Enzyme

Im Rahmen des oxidativen Metabolismus kann unterschieden werden zwischen prooxidativen und anti-oxidativen Enzymen. Zu der ersten Gruppe gehören NOS, NOX und die Xanthin-Oxidoreduktase (XOR).

Tabelle 1: Überblick der Isoformen von prooxidativen und antioxidativen Enzymen

Funktion	Enzyme und deren Isoformen
prooxidativ	NOS: nNOS, iNOS, eNOS (44)
	NOX: NOX-1, -2, -3, -4, -5, DUOX-1, -2 (48)
	XOR: Xanthin-Oxidase (XO) und Xanthin-Dehydrogenase (XDH) (49)
antioxidativ	Superoxid-Dismutase (SOD): SOD I, -II, -III (41, 50)
	Glutathion-Peroxidase (GPX): GPX-1, -2, -3, -4 (51)
	Katalase (CAT): CAT-1, -2, -3, -4, -5 (52)
	Hämoxygenase (HO): HO-1, -2 (53)

Es gibt drei Isoformen von NOS (44): die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS oder NOS I), die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS oder NOS II) und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS oder NOS III). Die nNOS ist in hoher Konzentration im zentralen Nervensystem (ZNS) zu finden und ihre Aktivität ist, wie auch bei der eNOS, Calcium- und Calmodulin-abhängig (44). Die iNOS wird unter physiologischen Bedingungen kaum exprimiert. Ihre Produktion wird in aktivierten Immunzellen stimuliert z.B. durch bakterielle Bestandteile, Zytokine und andere inflammatorische Moleküle (44). Ihre Tätigkeit wird von der intrazellulären Calcium-Konzentration nicht beeinflusst (44). Die eNOS wird in vaskulären Endothelzellen exprimiert und hat eine besondere Bedeutung bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Diese ist definiert als verminderte Vasodilatationsfähigkeit gegenüber mechanischen Reizen oder endothelabhängigen Vasodilatoren und kann durch pathophysiologische Faktoren wie Hypercholesterinämie (54), Hypertension (55), und Ischämie (56).

Bei dem Transmembranprotein NOX wurden insgesamt sieben Isoformen beschrieben (48): NOX 1, NOX 2, NOX 3, NOX 4, NOX 5, DUOX (Dual-Oxidase) 1 und 2. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von ROS (44) und katalysiert die Reduktion von Sauerstoff in ein Superoxid-Anionradikal durch die Elektronenübertagung von NADPH auf FADH (Flavin-Adenin-Dinukleotid in reduzierter Form) (48). Bedard und Krause beschrieben diverse physiologische Funktionen der NOX-Familie, darunter (48) eine Immunabwehraktivität durch ROS-abhängige Tötung von Bakterien und Viren oder Inaktivierung von bakteriellen

oder viralen Faktoren bzw. Bestandteilen, PH-Regulation in Phagosomen und Interaktion mit Protonen-Kanälen, Regulation des Zellenwachstums und der Zellenalterung, antiinflammatorische Aktivität, Aktivierung von zahlreichen intrazellulären Signalwegen und Enzymen und Genexpression.

Ein prooxidatives Enzym ist ebenso die Xanthin Oxydoreduktase (XOR). Unter XOR wird das Enzym gekennzeichnet, was die beide interkonvertierbare Isoformen Xanthin Oxydase (XO) und Xanthin Dehydrogenase (XDH) umfasst (57). XO ist die dominante Isoform im extrazellulärem Raum, während XDH hauptsächlich intrazellulär exprimiert wird (58). Das Enzym katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und anschließend von Xanthin zu Harnsäure, mit paralleler Entstehung eines Superoxid-Anionradikals und Wasserstoffperoxid (49).

Im Gegensatz zu dieser Gruppe von Enzymen gehören die Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxydase (GPX), Katalase (CAT) und Hämoxygenase (HO) zur anti-oxidativen Gruppe. Die Superoxid-Dismutase ist das Enzym mit der wesentlichsten antioxidativen Aktivität (41). Es bestehen drei SOD-Isoformen (41, 50): SOD I (oder Kupfer/Zink (Cu/Zn)-SOD) kommt hauptsächlich im Zytosol vor. Die SOD II (oder Mangan (Mn)-SOD) befindet sich in den Mitochondrien. Die SOD III (oder Extrazelluläre (EC)-SOD) ist die extrazelluläre Isoform. Funktionell katalysiert dieses Enzym die oxydoreduktive Reaktion der „Dismutation“ oder Disproportionierung (59) vom Superoxid-Anionradikal in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid.

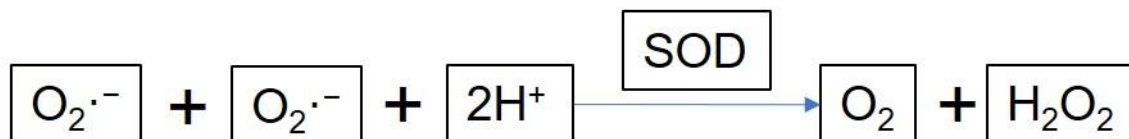


Abbildung 4: Darstellung der Dismutation vom Superoxid-Anionradikal in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, durch die enzymatische Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) nach (59). $\text{O}_2^{\cdot-}$: Superoxid-Anionradikal; H^+ : Proton; O_2 : Sauerstoff; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid.

Neben den enzymatischen antioxidativen Systemen bestehen die nicht-enzymatischen Antioxidantien, die in direkte und indirekte eingeordnet werden (60). Direkte nicht-enzymatische Antioxidantien wie zum Beispiel Glutathion, Vitamin C, Vitamin E und Carotenoide (61), können mit ROS und RNS direkt reagieren und sie neutralisieren (32, 60). Indirekte, nicht-enzymatische Antioxidantien sind sogenannte Chelatbildner (62) und verhindern die Entstehung von Radikalen durch die Bindung mit Metallionen wie Eisen (Fe^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}) (60).

2.2.4 Einfluss von reaktiven Spezies auf das Endothel

Oxidativer Stress ist die wichtigste Ursache der endothelialen Dysfunktion (63). Das Superoxid-Anionradikal wird insbesondere durch die Aktivität der NADPH-Oxidase produziert. NOX ist die Hauptquelle von ROS in Immunzellen und im Endothel (64). Hierbei zeigten Zadeh et al. (54), dass in retinalen Arteriolen eines Mausmodells mit Hypercholesterinämie, die LOX-1-Rezeptorkaskade durch NOX 2 die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies auslöst (65-67).

Durch die Reaktion des Superoxid-Anionradikals und Stickstoffmonoxid wird das Peroxynitrit-Anion generiert (68). In Gegenwart hoher Konzentrationen von diesem RNS wird ein Co-Faktor der eNOS, das (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4) zu einem Trihydrobiopterin-Radikal ($BH_3\cdot$) oxidiert (69, 70). $BH_3\cdot$ kann wiederum 6,7-[8H]-Dihydrobiopterin (BH_2) zügig umwandeln (44, 71). Durch die sogenannte „Entkopplung“ der eNOS wird ihre Funktionalität verändert (44). Dadurch wird die Sauerstoff-Reduktion und die NO-Entstehung von der eNOS entkoppelt wodurch das Enzym Superoxid-Anionradikale statt Stickstoffmonoxid produziert (44, 72).

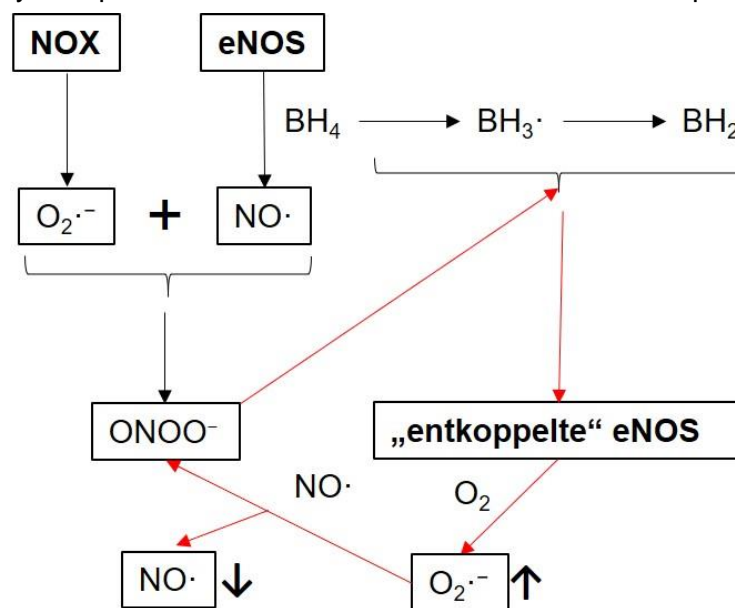


Abbildung 5: Überblick der Reaktionen nach (44), die durch NOX und eNOS zur endothelialen Dysfunktion führen. $O_2\cdot^-$: Superoxid-Anionradikal; $NO\cdot$: Stickstoffmonoxid; $ONOO^-$: Peroxynitrit-Anion; O_2 : Sauerstoff; BH_4 : (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin; $BH_3\cdot$: Trihydrobiopterin-Radikal; BH_2 : 6,7-[8H]-Dihydrobiopterin; NOX: NADPH-Oxidase; eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase.

Durch die reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, das unter physiologischen Umständen die Gefäßrelaxation sowie wichtige Signalwege im Blutgefäßsystem reguliert, entsteht eine endotheliale Dysfunktion (63). Im Rahmen einer Hypercholesterinämie, Atherosklerose sowie arterieller Hypertonie kommt es zu einer endothelialen Dysfunktion, die zusammen mit oxidativem Stress und Entzündungsprozessen auftritt (15, 54, 63). Mit einer endothelialen Dysfunktion sind auch Augenerkrankungen wie das Glaukom, die altersbedingte Makuladegeneration und die diabetische Retinopathie in Zusammenhang gebracht worden (27).

2.3 Bedeutung von Apolipoprotein E und LDL

Cholesterin wird im Kreislauf durch spezifische Proteine transportiert, Lipoproteine niedriger Dichte (*engl.* Low Density Lipoprotein, LDL), Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte (*engl.* Very Low Density Lipoprotein, VLDL), Lipoproteine mit mittlerer Dichte (*engl.* Intermediate Density Lipoprotein, IDL) und Lipoprotein A (73, 74). Erhöhte Serumspiegel von LDLs, VLDLs und IDLs sind mit der Entstehung atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert (75).

Neben diesen Transportproteinen bestehen andere, die den Transport in gegenläufige Richtung aufnehmen, Lipoproteine hoher Dichte (*engl.* High Density Lipoprotein, HDL), welches Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zum Metabolisieren in die Leber transportieren (reverser Transport des Cholesterins, *engl.* Reverse Cholesterol Transport, RCT). Die HDLs verfügen über erhebliche antiatherogene Eigenschaften wie antioxidative, antiapoptotische, antithrombotische Potenziale (76, 77). Jedoch wird in der Literatur die Bedeutung von HDL revidiert, da gezeigt wurde, dass im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen wie Myokardinfarkt und koronarer Herzkrankheit (77, 78), Herzinsuffizienz (79), und Schlaganfällen (80) HDLs hinsichtlich ihrer antiatherogenen Fähigkeiten dysfunktional werden.

Struktureller und funktionaler Bestandteil eines Lipoproteins ist das sogenannte Apolipoprotein (Apo), ein großer supramolekularer Komplex, der aus Lipiden, Proteinen und auch Nukleinsäuren besteht (81). Eine grundsätzliche Fähigkeit der Apolipoproteine ist es, Phospholipide einzukapseln und sie in einer diskoidalen Doppelschichtstruktur vorzuhalten, sodass eine ideale Lage aufgebaut wird, um hydrophobe Biomoleküle (wie Cholesterin) zu transportieren (81). Es bestehen diverse Formen von Apolipoproteinen (81). Besonders hervorzuheben ist die Rolle von Apolipoprotein E (ApoE) bei der Entstehung einer Hypercholesterinämie. Es wurde gezeigt (13-15, 54, 82), dass Mäuse in denen das Gen für ApoE fehlt (ApoE^{-/-}), zügig eine spontane Hypercholesterinämie und darauffolgend Atherosklerose entwickeln. Daher ist ein solches Tiermodell im Rahmen von Studien über Hypercholesterinämie von wesentlicher Relevanz.

Eine allgemeingültige Definition von Hypercholesterinämie wird kontrovers diskutiert (83). Civeira et al. empfehlen eine Definition basierend auf dem Serumspiegel von LDLc (LDLs, die das Cholesterin transportieren: LDL-Cholesterin) und nicht-HDLc (HDLs, die das Cholesterin transportieren: HDL-Cholesterin). Eine Hypercholesterinämie besteht, wenn ein Spiegel von *LDLc* ≥ 160 mg/dl und/oder ein Spiegel von *nicht-HDLc* ≥ 130 mg/dl bestimmt wird. Eine Einordnung von Hypercholesterinämie wird wie folgt bezeichnet (83):

Tabelle 2: Klassifikation von Hypercholesterinämie nach (83)

<i>Primäre Hypercholesterinämie:</i> genetisch (dominant, rezessiv, komplex) oder idiopathisch.
<i>Sekundäre Hypercholesterinämie:</i> bedingt durch z.B. Hypothyreose oder nephrotisches Syndrom, Cholestase, Gestation, Anorexia nervosa oder durch Medikamente wie Kortikosteroide, anabole Steroide, Immunsuppressiva, Protease Inhibitoren.
<i>Multifaktorielle Hypercholesterinämie:</i> zählt zu dem häufigsten Formen von Hypercholesterinämie und besteht bei fehlenden Kriterien für primäre oder sekundäre Hypercholesterinämie. Außerdem kann sie mit Hypertriglyceridämie assoziiert sein, bei der sogenannten „familiäre kombinierte Hyperlipidämie“.

Im Rahmen einer Hypercholesterinämie führt ein Übermaß von LDLs zu einer reduzierten Aktivität der anti-oxidativen Systeme wie Glutathion, Superoxid Dismutase (SOD), Katalase (CAT) sowie zur steigenden Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) (2, 84). In diesem Kontext spielen die sogenannte oxidierten LDL („oxLDLs“) eine Hauptrolle in der atherogenen Pathogenese. Parthasarathy et al. definierten die Ox-LDLs als „zirkulierende LDLs, die Peroxide enthalten oder sie oder deren Metabolite mit Peroxiden assoziiert sind“ (85). Ox-LDLs entstehen in hohen Konzentrationen bei frühen vaskulären Läsionen der Atherosklerose (86) durch Mechanismen, in denen Enzyme von aktivierten Immunzellen aus der extrazellulären Matrix oxidativen Stress mit der Entstehung von ROS hervorrufen (87, 88). Carr et al. beschrieben zwei Hauptmechanismen, die an der Oxidation von LDLs beteiligt sind:

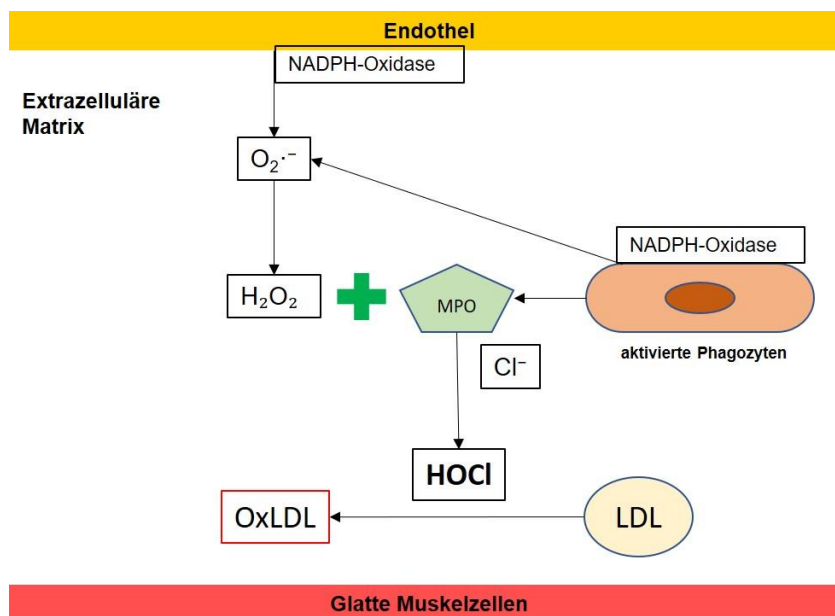


Abbildung 6: Extrazelluläre Darstellung der Entstehung von oxidativen LDLs durch den MPO-Mechanismus nach (47). Aktivierte Phagozyten sezernieren MPOs und diese katalysieren die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxiden (H_2O_2) und Chlorid (Cl^-), mit der folgenden Entstehung von Hypochlorsäure (HOCl). Diese reagiert direkt mit den LDLs und generiert OxLDLs. MPO: Myeloperoxidase. NADPH-Oxydase (NOX): Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxydase.

- der Mechanismus durch die MPO, die von aktivierten Phagozyten in die extrazelluläre Matrix sezerniert wird. MPO generiert OxLDLs durch die Entstehung von Hypochlorsäure (HOCl) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Chlorid (Cl^-) (47).

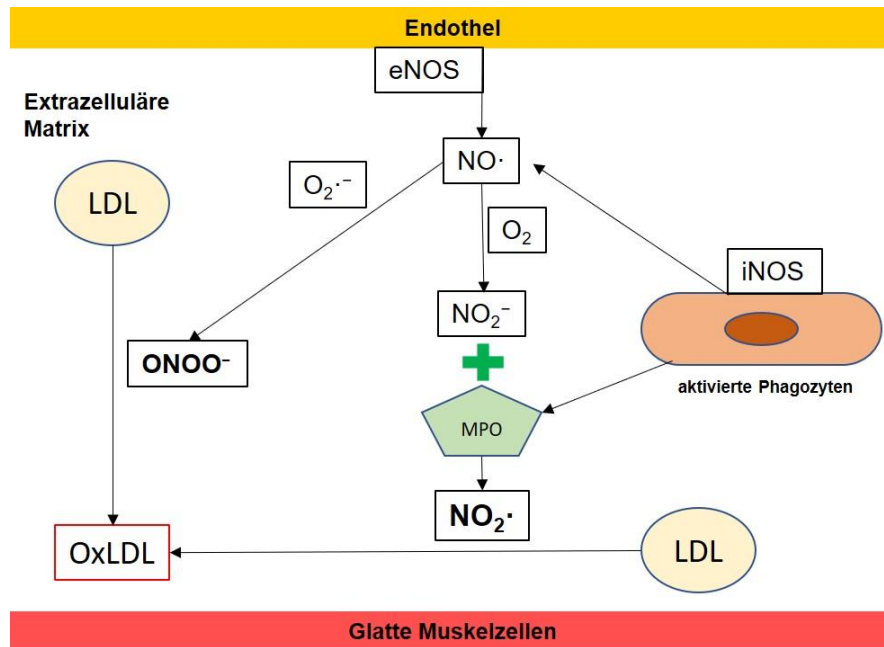


Abbildung 7: Extrazelluläre Darstellung der Entstehung von oxidativen LDLs durch den RNS-Mechanismus nach (47). Aktivierte Phagozyten sezernieren MPOs und parallel durch iNOS (induzierte Stickstoffmonoxidsynthase) generieren Stickstoffmonoxide ($\text{NO}\cdot$). Diese wird auch vom Endothel durch eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase) produziert. Stickstoffmonoxyde reagiert sowohl mit Superperoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) und generiert Peroxynitrit-Anion (ONOO^-), als auch mit Sauerstoff mit der Entstehung von Nitriten (NO_2^-). Diese reagieren mit MPO (Myeloperoxidase) und produzieren Stickstoffdioxid ($\text{NO}_2\cdot$). Peroxynitrit-Anion und Stickstoffdioxid reagieren direkt mit den LDLs und generieren OxLDLs.

- der Mechanismus durch die Stickstoffradikalspezies, in denen iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase, engl. inducible nitric oxide synthase, NOS) bei Phagozyten und eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, engl. endothelial nitric oxide synthase, NOS) bei endothelialen Zellen erheblichen Anteil von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) generieren. Dieses reagiert relativ zügig mit Superperoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) und produziert das Peroxynitrit-Anion (ONOO^-), das direkt beteiligt ist an der OxLDL-Entstehung. Außerdem generiert das Stickstoffmonoxid in Gegenwart von Sauerstoff Nitrit (NO_2^-). Anschließend reagiert die MPO mit Nitrit und generiert Stickstoffdioxid ($\text{NO}_2\cdot$), das wie ONOO^- , direkt die LDLs oxidieren kann (47).

2.4 Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bei Hypercholesterinämie

2.4.1 Der LOX-1 Rezeptor und seine Signalwege

In Hinsicht auf vaskuläre atherosklerotische Schäden wird die Bedeutung von oxLDLs in der Literatur ausführlich beschrieben. Couto et al. beobachteten in Nabelvenen von Menschen, dass OxLDLs nicht nur biomechanische Veränderungen und Schäden durch direkten Kontakt mit den endothelialen Zellen auslösen, sondern auch einen relevanten Einfluss auf diverse zelluläre Signalwege haben (89, 90), insbesondere durch einen Rezeptor in der Zellmembran, den LOX-1 Rezeptor (Lektinähnlicher oxidativer Lipoprotein-Rezeptor-1 niedriger Dichte; *engl.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein Receptor-1). Dabei handelt es sich um einen Transmembran-Rezeptor, der bedeutendste für OxLDLs in endothelialen Zellen (91).

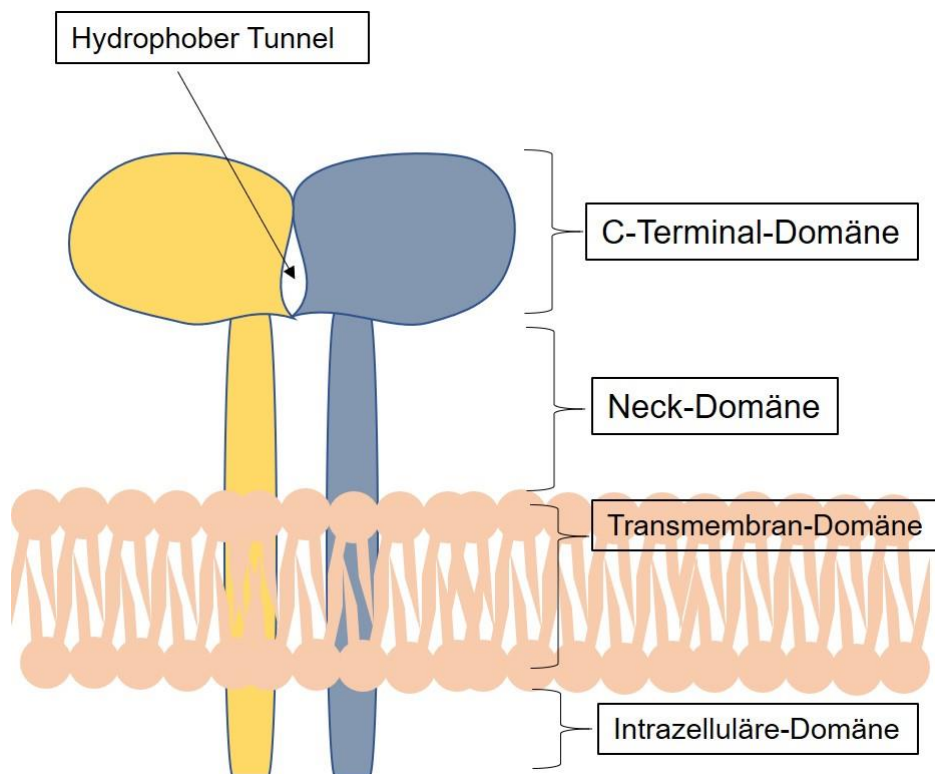


Abbildung 8: Darstellung der molekularen Struktur des Rezeptors LOX-1 nach (93).

Der LOX-1 Rezeptor ist von besonderer Bedeutung in der Pathogenese der Atherosklerose (92). In Hinblick auf seine molekulare Struktur ist der LOX-1 Rezeptor ein Dimer. Jedes Monomer hat insgesamt vier Domänen (93): zwei davon sind extrazelluläre Domänen (C-Terminal-Domäne und Neck-Domäne), eine Transmembran-Domäne und eine Intrazelluläre-Domäne. Die C-terminale Domäne ist die Region, in der die zwei Monomere zusammenkommen und zuständig für die Bindung mit oxidativen LDLs. Hierbei ist für die Funktion des Rezeptors der sogenannte „Hydrophobe Tunnel“ essenziell, eine Region mit höher Affinität für die Bindung mit hydrophoben Molekülen, wie zum Beispiel Ox-LDLs (93).

Im Vergleich zum LOX-1-Rezeptor sind OxLDLs große Moleküle: diese können einen maximalen Durchmesser von bis zu ca. 250 Å (oder 25 nm) haben, während der maximale Durchmesser der bindenden Region (C-Terminal-Domain) des Rezeptors LOX-1 bei 70 Å (oder 7 nm) liegt (91). Diverse Studien schlagen vor, dass wenn drei LOX-1 Rezeptoren ein Ox-LDL zusammenbinden, eine stabile Bindung besteht (91, 92, 94).

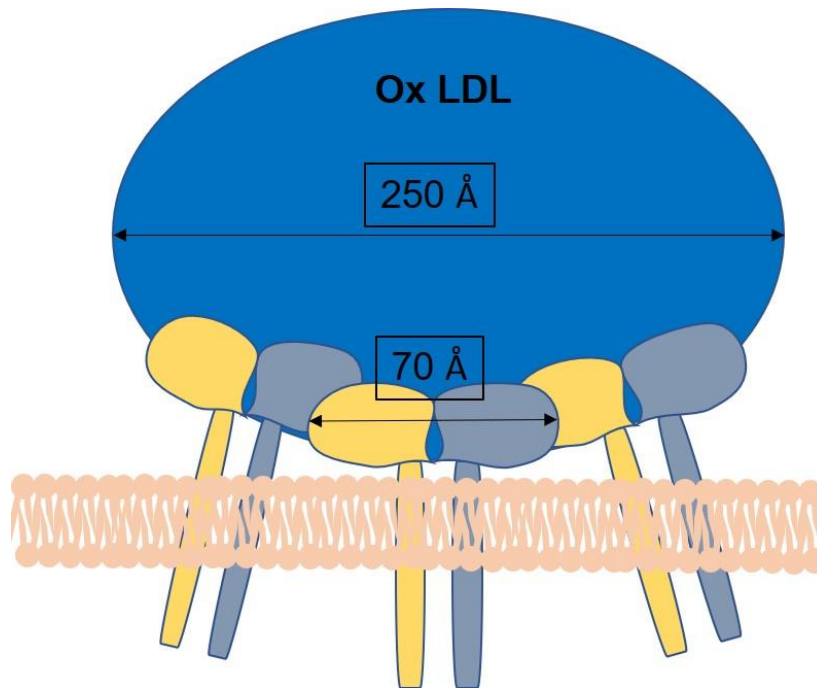


Abbildung 9: Darstellung einer Bindung zwischen Ox-LDL und LOX-1 Rezeptoren nach (91,92,94)

Die intrazelluläre Domäne des LOX-1 Rezeptors ist zuständig für die Aktivierung zahlreicher Proteine und intrazellulärer Signalwege (65, 66), wie zum Beispiel der NADPH-Oxidase (*NOX1,2,4*) mit darauffolgender ROS-Entstehung; der Caspase (*Casp3* und *Casp9*), die zur Apoptose führen; von Janus-Kinasen (*JNKs*), die die Aktivität von Arginase I und Arginase II hemmen und so die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) reduzieren; von *NF-κB* (Transkriptionsfaktor, der an den Promotor leichter κ-Ketten (Kappa-Ketten) von B-Lymphozyten bindet (*engl. nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells*), die eine Produktion pro-inflammatorischer Zytokinen auslöst (67); des Transformierenden Wachstumsfaktors Beta (*engl. transforming growth factor beta, TGF-β*), der eine Fibrose hervorruft; des Wachstumsfaktors aus Thrombozyten (*engl. platelet-derived growth factor, PDGF*), des epidermalen Wachstumsfaktors (*engl. epidermal growth factor, EGF*) und des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (*engl. insulin-like growth factor 1, IGF-1*), der die vaskuläre Proliferation von glatten Muskelzellen aktiviert (*engl. vascular smooth muscle cell, VSMC*) (66). Insgesamt werden dadurch Kaskaden aktiviert, die zur Vasokonstriktion, Inflammation, endothelialen Dysfunktion, Neovaskularisation, Apoptose, Fibrose, Thrombose und letztendlich zur Atherogenese führen (65).

2.4.2 Primäre Hypercholesterinämie Vs. Metabolisches Syndrom

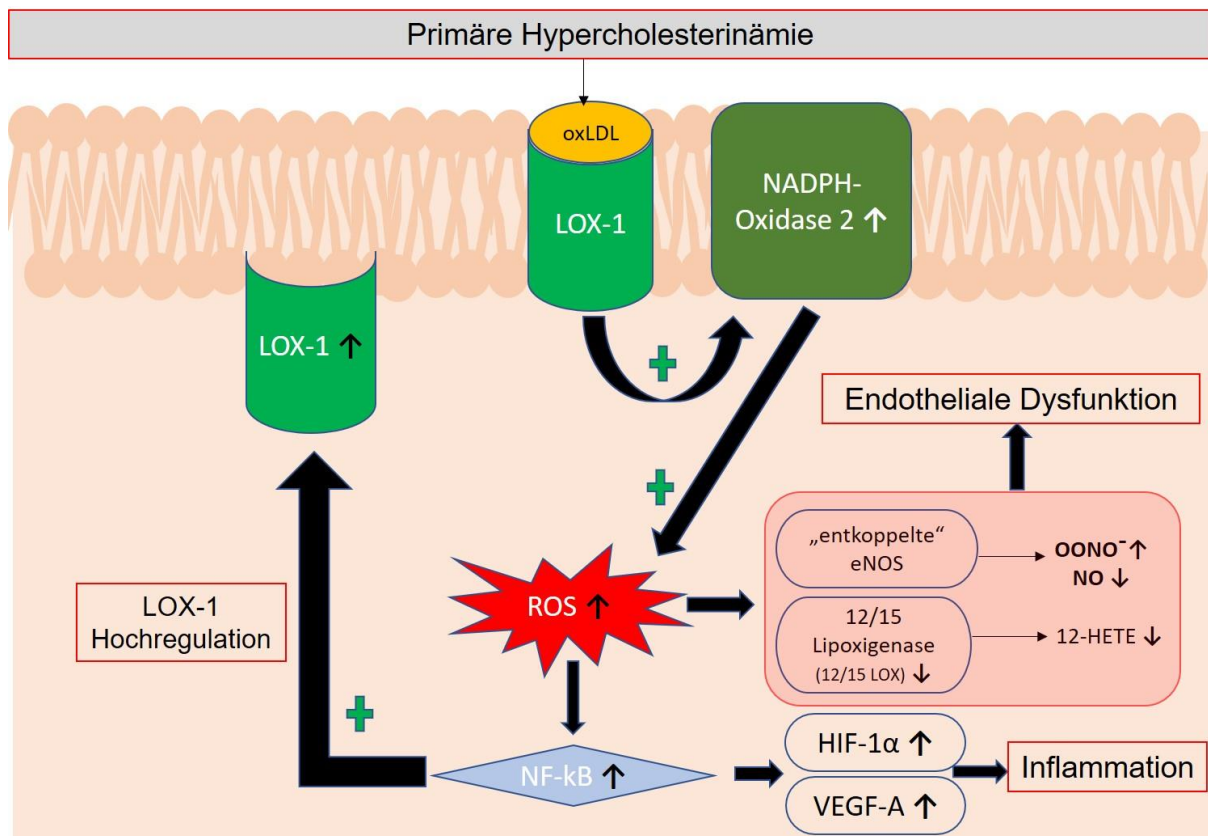


Abbildung 10: Überblick der intrazellulären Kaskade auf Endothelebene bei primärer Hypercholesterinämie. Insbesondere relevant für die ROS-Entstehung ist die Aktivität der NADPH-Oxidase 2. Die ROS-Entstehung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB sowie zur Beeinträchtigung der Funktion der eNOS und der 12/15 Lipoxigenase (12/15 LOX), sodass eine Inflammation, eine endotheliale Dysfunktion und eine Hochregulation des LOX-1-Rezeptors ausgelöst werden.

Bei primärer Hypercholesterinämie werden erhöhte LDLc-Substrate in Ox-LDLs oxidiert. Diese können Kaskaden auslösen, die zur Entstehung erheblicher Mengen an ROS führen können (95). Insbesondere durch den LOX-1-Rezeptor aktivierten OxLDLs den Signalweg von NADPH-Oxidasen (54, 56, 65). Hierbei zeigten Zadeh et al. in Querschnitten von retinalen Arteriolen von ApoE^{-/-}-Mäusen (54), dass die Isoform NOX 2 verantwortlich für eine Steigerung intrazellulärer Konzentrationen von ROS ist. Die ROS lösen die Aktivierung von NF-kB aus (65), sowie eine Veränderung der Aktivität von zwei Enzymen, die im Endothel die vasodilatatorische Antwort regulieren (96), der eNOS und der 12/15 Lipoxigenase (12/15 LOX). Laursen et al. beschrieben, dass in Gegenwart erhöhter Konzentrationen von ROS durch die Oxidation des eNOS Kofaktors Tetrahydrobiotperin (BH₄) die eNOS entkoppelt wird. Damit ersetzt das „entkoppelte“ eNOS die Bildung von Stickstoffmonoxiden (NO) mit der Entstehung vorerst von Superperoxid (O₂⁻) (44), und schließlich von Peroxinitrit-Anion (OONO⁻) (97). Aufgrund der fehlenden Produktion von NO ergibt sich hieraus oxidativer Stress und eine endotheliale Dysfunktion (97). Die endotheliale Dysfunktion wird verstärkt, aufgrund der ROS-induzierten Hemmung der 12/15-Lipoxygenase, durch eine mangelnde Entstehung der 12-Hydroxyeicosatetraenoic Säure (*engl.* 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12-HETE) (55).

Der aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (*engl.* vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) (98) und dem Hypoxie-induzierten Faktor 1-Alpha (*engl.* hypoxia-inducible factor, HIF-1 α) (99), die unter anderem eine Entzündung und Neovaskularisation hervorrufen können, sowie zur Hochregulation des LOX-1 Rezeptors (67). Ebenso stimulieren ROS die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor Alpha (*engl.* tumor necrosis factor alpha, TNF- α), Interleukin-1 β und Interleukin-6 (27, 63).

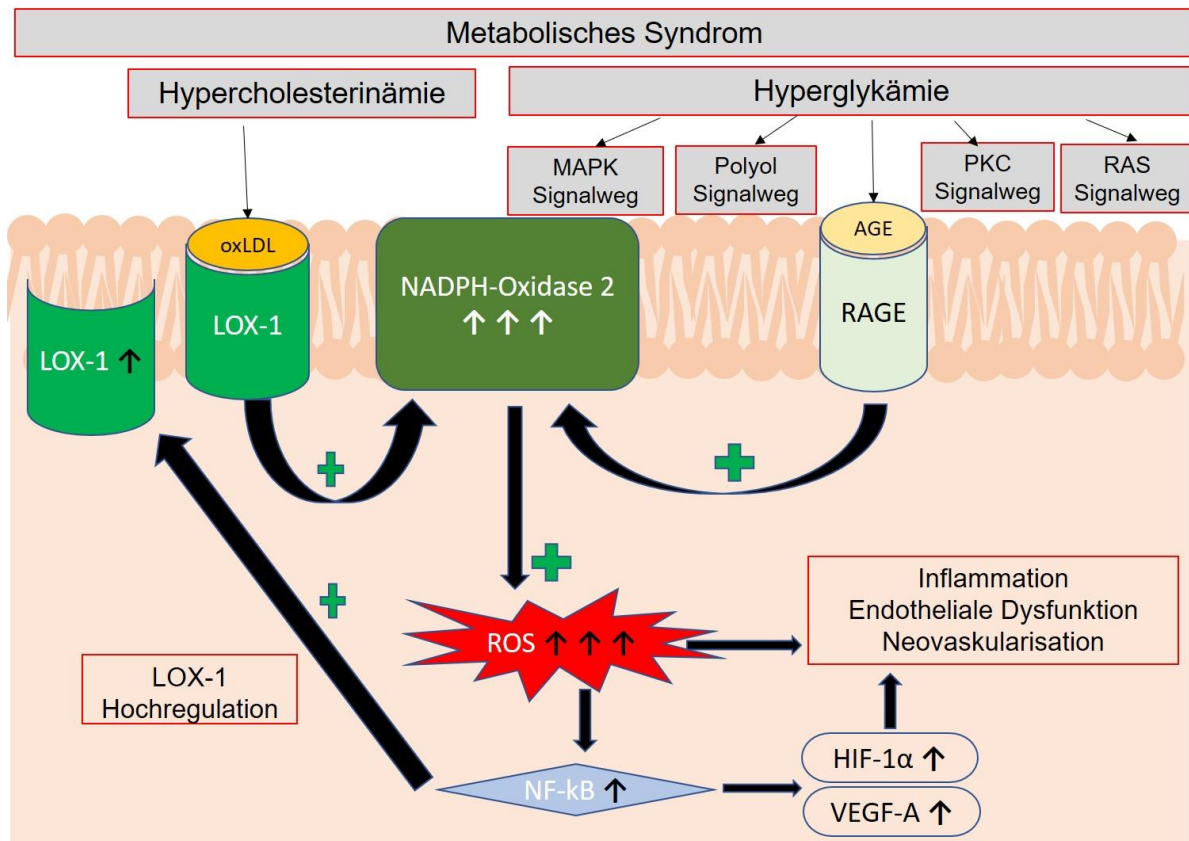


Abbildung 11: Überblick der intrazellulären Kaskade auf Endothelebene bei metabolischem Syndrom. Hierbei besteht zusätzlich mit Hypercholesterinämie auch Hyperglykämie, mit folgender verstärkter ROS-Entstehung und darauffolgender größerer Gewebebeschädigungen durch die Aktivierung weiterer diverser Signalwege.

Im Rahmen eines metabolischen Syndroms kann parallel mit einer Hypercholesterinämie eine Hyperglykämie bestehen, die weitere unterschiedliche Signalwege im Endothel aktiviert. Insbesondere relevant hinsichtlich der endothelialen Dysfunktion ist die Aktivierung des Rezeptors für fortgeschrittene Endprodukte der Glykierung (*engl.* receptor for advanced glycation endproducts, RAGE) (100), der zu einer Aktivierung der NOX 2 führen kann (101), was die intrazelluläre ROS-Konzentrationen im Vergleich zu einer primären Hypercholesterinämie verstärken kann. Daraufhin tragen weitere Kaskaden wie der MAPK- (Mitogen aktivierter Protein Kinase), Polyol-, PKC- (Protein Kinase C) und RAS- (Renin-Angiotensin System)-Signalweg (102-105) zu einer erheblichen Verstärkung von oxidativem Stress bei.

2.5 Zentrale Hypothesen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollen die folgenden Hypothesen geprüft werden:

1. Dass in der Arteria ophthalmica der Maus in einem Hypercholesterinämie-Modell eine endotheliale Dysfunktion hervorgerufen wird.

2. Dass die Aktivierung des LOX-1-Rezeptors in der Arteria ophthalmica die Entstehung radikaler Sauerstoffspezien auslöst.

Des Weiteren sollen die Mechanismen untersucht werden, die in der Arteria ophthalmica eine Hypercholesterinämie-bedingte endotheliale Dysfunktion hervorrufen. Dabei wird die Aorta als Kontrollgewebe verwendet, da hier Hypercholesterinämie-bedingte Schäden bereits in der Literatur beschrieben wurden.

3. Material und Methoden

3.1 Tiermodell

Die Experimente wurden genehmigt durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Deutschland (AZ: 23 177-07/G 13-1-034), und wurden nach den ARVO-Leitlinien für die Verwendung von Versuchstieren in der Augenheilkunde und ophthalmologischer Forschung durchgeführt. Mäuse, denen das Gen für Apolipoprotein E (ApoE^{-/-}) fehlte und Wildtyp-Kontrolltiere (C57BL/6J) stammten aus The Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA. Männliche Mäuse wurden mit Standardernährung für Nagetiere (Altromin, Lage, Deutschland) gefüttert und in einem Alter von 12 Monaten für Experimente verwendet. In einer zuvor durchgeführten Studie, in der wir Mäuse aus unserem Bestand und mit gleicher Fütterung einsetzten, stellten wir fest, dass der Plasmaspiegel von Lipoproteinen mit niedriger Dichte (LDL) bis um das 3-4-fache in zwölf Monate alten Mäusen erhöht war (54). Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten, mit zwölf-stündigem Licht/Dunkel-Zyklus, einer Temperatur von 22±2 °C, einer Feuchtigkeit von 55±10%, und mit freiem Zugang zu Nahrung und Trinkwasser.

3.2 Vorbereitung der Gefäßstudien

3.2.1 Präparation der Arterien und Vorbereitung auf das Experiment

Die Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Zunächst wurden die Aorta abdominalis und die Arteria ophthalmica mittels einer Vannas-Schere und einer Mikropinzette isoliert und in eine Petrischale mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer gelegt. Die Pufferlösung hatte die folgende ionische Zusammensetzung (in mM): 118.3 NaCl, 25.0 NaHCO₃, 11.0 Glukose, 4.7 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄. Die für die Pufferlösung verwendeten Salze wurden von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, bezogen. Daraufhin wurden Segmente der Aorta und der Arteria ophthalmica von umliegendem Gewebe gesäubert, in eine Perfusionskammer transferiert, mittels zweier Mikropipetten kanüliert und über diese einem Innendruck ausgesetzt (15, 106, 107). Der Innendruck in den Aortensegmente wurde auf 80 mmHg und in der Arteria ophthalmica auf 50 mmHg festgelegt. Die Perfusionskammer wurde mit kohlensäurehaltigem und oxygeniertem Krebs-Henseleit-Puffer bei 37° C und einem pH-Wert von 7.4 perfundiert. Das Blutgefäß wurde durch eine an einem invertierten Mikroskop angeschlossene Videokamera abgebildet.

3.2.2 Integritätsprüfung der Arterien

Die Arterien wurden 45 Minuten vor Beginn der funktionalen Studie equilibriert. Es wurden für die Experimente ausschließlich Blutgefäße verwendet, die infolge einer Perfusion mit hochkonzentrierter KCl Lösung (100 mM) eine Verengung von mindestens 20% (Aorta) oder von 50% (Arteria ophthalmica) des luminalen Gefäßruhedurchmessers erzielten.

3.3 Durchführung der Gefäßstudien

3.3.1 Funktionelle Studien gegenüber Phenylephrin, Nitroprussid, Acetylcholin

Es wurden zunächst Konzentrations-Wirkungskurven in isolierten Segmenten der Arteria ophthalmica und der Aorta abdominalis für den nicht-subtypselektiven α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin (10^{-8} - 10^{-3} M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) erstellt. Danach wurden die Gefäßsegmente durch Titration von Phenylephrin auf etwa 50% des Ausgangsdurchmessers vorkontrahiert, um Konzentrations-Wirkungskurven für den endothelunabhängigen Vasodilatator, Nitroprussid (10^{-9} - 10^{-4} M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und für den endothelabhängigen Vasodilatator, Acetylcholin (10^{-9} - 10^{-4} M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zu erstellen.

In einer zweiten Serie an Experimenten wurden verschiedene Inhibitoren angewendet, um Signalwege der endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria ophthalmica zu bestimmen. Nachdem eine Konzentrations-Wirkungskurve für Acetylcholin (10^{-9} - 10^{-4} M) gewonnen wurde, erfolgte nach zehnmütigem Auswaschen des Gefäßsegments und einer anschließenden Inkubation mit dem jeweiligen Blocker für 30 Minuten eine erneute Konzentrations-Wirkungskurve gegenüber Acetylcholin (10^{-9} - 10^{-4} M) am vorkontrahierten Gefäß.

3.3.2 Inkubation mit NOS- und COX-Inhibitoren

Um die Beteiligung der drei NOS- Isoformen an der endothelabhängigen Vasodilatation zu untersuchen, wurden die Gefäßsegmente entweder mit dem Arginin-Analogon, N $_{\omega}$ -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME, 10^{-4} M, Sigma-Aldrich), einem nicht-isoform-selektiven NOS Inhibitor, 1-[2-(Trifluoromethyl)Phenyl]Imidazol (TRIM, 10^{-4} M, Sigma-Aldrich), einem selektiven Inhibitor der neuronalen NOS (nNOS) oder mit Aminoguanidin (3×10^{-4} M, Sigma-Aldrich), einem selektiven Inhibitor der induzierbaren NOS (iNOS) inkubiert. Da bisher keine hochselektiven Inhibitoren für eNOS verfügbar sind, musste die Beteiligung der eNOS an der Vasodilatation aus Experimenten mit nNOS, iNOS und einen nicht-selektiven NOS-Inhibitor abgeleitet werden. Um den Beitrag der Metaboliten der Cyclooxygenase (COX) an der endothelabhängigen Vasodilatation zu bestimmen, wurde die Reaktivität gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit Indometazin (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), einem nicht-isoform-selektiven Inhibitor der Cyclooxygenase (*engl.* cyclooxygenase, COX) 1 und 2 getestet. Zudem wurde die Wirkung einer kombinierten Blockade von COX und NOS untersucht, durch eine gleichzeitige Inkubation mit L-NAME (10^{-4} M) und Indometazin (10^{-5} M), um die Möglichkeit auszuschließen, dass sich die Signalwege gegenseitig kompensieren.

3.3.3 Testung der EDHF-abhängigen Vasodilatation

Um die Beteiligung der endothelabhängigen Hyperpolarisationsfaktoren (*engl.* endothelium-derived hyperpolarizing factors, EDHFs) an der Acetylcholin-vermittelten Vasodilatation zu ermitteln, wurde die Reaktionsfähigkeit der Arteria ophthalmica gegenüber Acetylcholin in Gegenwart von L-NAME und Indometazin vor und nach Inkubation mit KCl (30 mM) getestet. KCl (30 mM) verhindert die Hyperpolarisation an der Zellmembran und somit die EDHF-abhängige Vasodilatation.

Um einzelne EDHF-Signalwege zu testen, wurde die Reaktivität der Arteria ophthalmica gegenüber Acetylcholin in Gegenwart von L-NAME und Indometazin vor und nach Inkubation mit 17-Octadecyensäure (17-ODYA, 10^{-4} M, Tocris Bioscience, Bristol, UK), einem Inhibitor des Cytochrom-P450-Monooxygenase-Signalweges, mit Baicalein (10^{-5} M, Sigma-Aldrich), einem spezifischen Inhibitor der 12/15-Lipoxygenase und mit 18α -Glycyrrhetinsäure (18α -GA, 3×10^{-5} M, Sigma-Aldrich), einem Gap Junction-Blocker getestet. Es wurde bereits beschrieben, dass in der EDHF-abhängigen Reaktivität der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen des C57Bl/6J-Hintergrundes, diese Signalwege beteiligt sind (96).

3.3.4 Testung der mechanischen Eigenschaften der Arteria ophthalmica

Im Rahmen einer chronischen arteriellen Hypertonie (108) oder einer Hypercholesterinämie (109), wurde in einigen Blutgefäßen ein Gefäßwandumbau beschrieben. In dessen Folge können sich Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der Gefäße einstellen, wie zum Beispiel Veränderungen des Spannung-Dehnung-Verhaltens, wie es in zerebralen Arteriolen bei einer chronischen Hypertonie festgestellt wurde (110). Um potentielle Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der Arteria ophthalmica im Rahmen der Hypercholesterinämie festzustellen, wurde das Verhältnis von Innen- und Außendurchmesser (μm) zum luminalen Druck (mmHg) sowie das Spannungs-Dehnungs-Verhalten der Gefäße in beiden Gruppen von Mäusen bestimmt. Für diese Messung wurde der glatte Gefäßmuskel durch eine 20-minütige Inkubation in 67 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, *engl.* ethylenediaminetetraacetic acid) inaktiviert, wie bei Baumbach et al. (2003) beschrieben (110). Dadurch verschwand der Eigentonus der Gefäße und eine maximale Gefäßrelaxation wurde erzielt. Danach, wurde der intraluminale Gefäßdruck über die Mikropipetten durch Anheben des angeschlossenen Reservoirs auf 80 mmHg angehoben und jede Minute um 10 mmHg reduziert, wobei für jede Druckstufe Gefäßinnen- und Außendurchmesser bestimmt wurden. Somit konnte das Verhältnis von Innen- und Außendurchmesser zum Druck bestimmt werden. Darüber wurde die Spannung (10^{-5} N-m²) als Verhältnis zwischen intraluminalem Druck und Innendurchmesser zur doppelten Gefäßwanddicke berechnet (111). Zusätzlich wurde die

Dehnung ($\Delta D/D_0$) berechnet, als Verhältnis zwischen der Differenz von Innendurchmesser und Ausgangsdurchmesser zum ursprünglichen Innendurchmesser (D_0), wobei der Ausgangsdurchmesser, den Durchmesser bei niedrigstem luminalen Druck, darstellen soll, was im Idealfall 0 mmHg wäre. Da bei diesem Druck die Gefäße jedoch kollabieren, haben wir einen Druck nahe 0 mmHg verwendet. Wie durch Baumbach et al. (1993) vorgeschrieben (112), dies waren 5 mmHg.

3.4 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydroethidium (DHE)

Die Superoxidbildung wurde in Kryoschnitten der Aorta und der Arteria ophthalmica durch den oxidativ fluoreszierenden Farbstoff Dihydroethidium (DHE) in situ ermittelt wie zuvor beschrieben (113). Nach Tötung der Mäuse und nach Isolierung der Aorta und der Arteria ophthalmica erfolgte die Anfertigung der Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10 µm. Nach dem Auftauen wurden die Gewebeschnitte direkt mit 10 µmol/l DHE für 30 Minuten inkubiert. Fotografien der Gefäßquerschnitte wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops mit einer 520 nm Anregungswellenlänge und 610 nm Emissionswellenlänge aufgenommen. Die Bestimmung der Färbungsintensität erfolgte mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.5 Nachweis der Genexpression von Redoxgenen mittels quantitativer PCR

Die Boten-RNA (mRNA) für die prooxidativen Redoxenzyme NOX1, NOX2, NOX4, und die Xanthindehydrogenase (XDH) wurde in der Aorta und in der Arteria ophthalmica von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) quantifiziert. Unter physiologischen Bedingungen ist die XDH hauptsächlich als Dehydrogenase aktiv. Verschiedene Stressbedingungen wie Hypoxie und Entzündung fördern jedoch ihre Konversion in die superoxidproduzierende Xanthinoxidase (XO), die zu einer Dysfunktion des Gefäßendothels und zur Atherosklerose beiträgt (114).

Direkt nach Tötung der Versuchstiere erfolgte die zügige Exzision der Blutgefäße und der Transfer in kalte phosphatgepufferte Lösung (PBS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Unter einem Stereomikroskop wurden die Gefäße von umliegendem Gewebe und Blut gesäubert und in kleine Stücke geschnitten. Zunächst wurden die Gewebeproben in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäße transferiert und zügig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Daraufhin erfolgte die Homogenisierung der Proben (FastPrep; MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) und die Isolierung der RNA mit dem RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die mRNA durch die M-MLV reverse Transkriptase und zufällige Hexamere (Promega, Mannheim, Deutschland) revers transkribiert. Die quantitative PCR erfolgte mit dem ViiA 7 System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). SYBR Green wurde für den DNA-Nachweis verwendet. Relative mRNA-Konzentrationen von Zielgenen wurden quantifiziert durch vergleichbare Schwellenwerte, die auf β -Aktin normiert wurden. Die mRNA-Expression wird als relative Veränderung bei ApoE^{-/-}-Modelle gegenüber Wildtyp-Mäusen dargestellt. Die PCR Primersequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Primersequenzen für die qPCR-Methode (V: vorwärts, R: rückwärts)

Gene	Zugangsnummer	Primersequenzen
NOX1	NM_172203.2	V: GGTTGGGGCTGAACATTTTTC R: TCGACACACAGGAATCAGGAT
NOX2	NM_007807.5	V: GCACCTGCAGCCTGCCTGAATT R: TTGTGTGGATGGCGGTGTGCA
NOX4	NM_015760.5	V: GGCTGGCCAACGAAGGGGTAA R: GAGGCTGCAGTTGAGGTTTCAGGACA
XDH	NM_011723.3	V: CGATGACGAGGACAACGGTA R: TGAAGGCGGTCATACTTGGAG
β -Aktin	NM_007393.5	V: CACCCGCGAGCACAGCTTCTTT R: AATACAGCCCGGGGAGCATC

3.6 Nachweis des Expressionsniveaus von Redoxgenen auf Proteinebene

Um das Expressionsniveau der prooxidativen Enzyme NOX1, NOX2, NOX4 und XDH/XO sowie des LOX-1-Rezeptors zu lokalisieren und zu bestimmen, wurden Gefäße von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen isoliert, mit 4% Paraformaldehyd über Nacht geregelt und in Paraffinblöcke eingebettet. Gefäßquerschnitte (7 µm Dicke) wurden mit jeweils einem Kaninchen-Antikörper inkubiert, zum Nachweis von NOX1 (Katalognummer: ab131088; Verdünnung 1:200, Inkubationszeit: 2h bei RT; Abcam, Waltham, MA, USA;), NOX2 (Katalognummer: ab129068, Verdünnung 1:200, Inkubationszeit: 2 h at RT; Abcam, Waltham, MA, USA), NOX4 (Katalognummer: ab109225; Verdünnung 1:200; Inkubationszeit: 2 h bei RT; Abcam, Waltham, MA, USA), XDH/XO (Katalognummer: NBP2-75717; Verdünnung 1:50; Inkubationszeit: 2 h bei RT; Bio-Techne GmbH, Wiesbaden, Deutschland), und des LOX-1-Rezeptors (Katalognummer: bs-2044R; Verdünnung 1:100; Inkubationszeit: 2h bei RT; BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland). Als sekundärer Antikörper, wurde ein polyklonaler Rhodamin Red-X-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (Katalognummer: 111-295-003; Verdünnung 1:200, Inkubationszeit: 1 h bei RT; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland;). Negativkontrollschnitte wurden mit Blockingmedium und sekundären Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mittels VECTASHIELD® Mounting-Medium mit DAPI (BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland) beladen und mit Deckgläschen bedeckt.

3.7 Statistische Auswertung

Die Wirkung des Vasokonstriktors Phenylephrin wird als relative Veränderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum ursprünglichen Durchmesser dargestellt, während die Reaktionen auf die Vasodilatoren Acetylcholin und Nitroprussid als relative Veränderung des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum vorkontrahierten Zustand beschrieben werden.

Die Zwei-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen sowie ein Bonferroni-Post Hoc-Test wurden zum Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten und die mRNA-Expressionsniveaus wurden mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests verglichen.

Das Signifikanzniveau war auf 0,05 festgelegt und n repräsentiert die Anzahl der Mäuse in der jeweiligen Gruppe.

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad PRISM (Version 6, GraphPad Inc., San Diego, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Gefäßreaktivität in der Aorta

Phenylephrin (10^{-8} - 10^{-3} M) löste eine konzentrationsabhängige Vasokonstriktion der Aorta aus, die sich zwischen Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen nicht unterschied. Die Minderung des luminalen Durchmessers bei 10^{-3} M betrug $59 \pm 8.9\%$ und $57 \pm 6.5\%$ bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen (Abbildung 12A). In mit Phenylephrin vorkontrahierten Aortensegmenten löste der endothelunabhängige Vasodilatator Nitroprussid (10^{-9} - 10^{-4} M) eine konzentrationsabhängige Vasodilatation aus, die sich nicht zwischen Aortensegmenten von Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen unterschied (Abbildung 12B). Die Zunahme des luminalen Durchmessers betrug bei 10^{-4} M Nitroprussid $54 \pm 11\%$ bei ApoE^{-/-}- und $63 \pm 14\%$ bei Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu waren die Antworten der Aortasegmente auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (10^{-9} - 10^{-4} M) bei ApoE^{-/-}-Mäusen deutlich verringert. Zum Beispiel war die Zunahme des luminalen Durchmessers gegenüber 10^{-4} M Acetylcholin $26 \pm 11\%$ bei ApoE^{-/-}- und $67 \pm 9.7\%$ ($P < 0.01$) bei Wildtyp-Mäusen. Dieses Ergebnis deutet auf eine endotheliale Dysfunktion bei ApoE^{-/-}-Mäusen hin (Abbildung 12C).

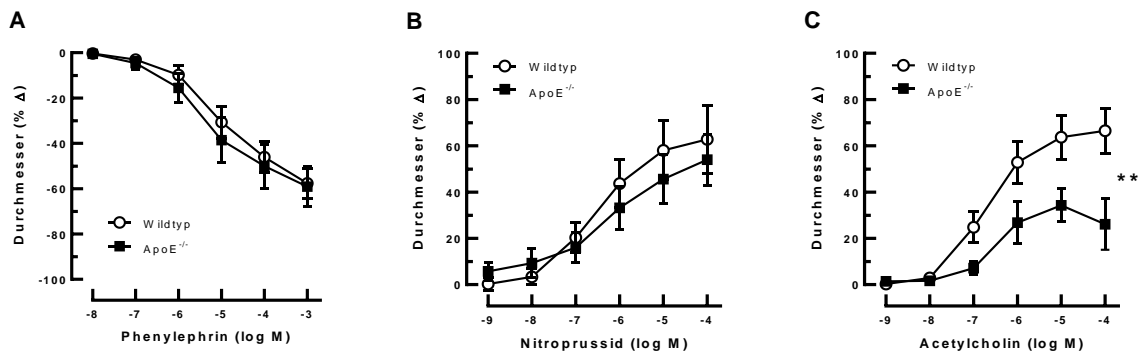


Abbildung 12 A-B-C: Gefäßreaktivität der Aorta bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber dem Vasokonstriktor Phenylephrin (A), dem endothelunabhängigen Vasodilatator Nitroprussid (B) und dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (C). Die Gefäßantwort der Aorta gegenüber Acetylcholin war bei ApoE^{-/-}- Mäusen reduziert. Die Daten sind als Mittelwert ± SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Genotyp; $**P < 0.01$).

4.2 Gefäßreaktivität in der Arteria ophthalmica

Phenylephrin (10^{-8} - 10^{-3} M) bewirkte eine konzentrationsabhängige vasokonstriktorische Antwort der Arteria ophthalmica, die bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen ähnlich ausgeprägt war. Die maximale Minderung des luminalen Durchmessers war $55 \pm 8.0\%$ und $51 \pm 5.4\%$ bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen bei 10^{-3} M (Abbildung 13A). Der endothelunabhängige Vasodilatator Nitroprussid (10^{-9} - 10^{-4} M) löste eine konzentrationsabhängige Vasodilatation aus, welche keinen Unterschied zwischen der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}- und von Wildtyp-Mäusen zeigte. Die Zunahme des luminalen Durchmessers als Antwort auf 10^{-4} M Nitroprussid betrug $68 \pm 13\%$ bei ApoE^{-/-}- und $78 \pm 11\%$ bei Wildtyp-Mäusen (Abbildung 13B). Interessanterweise waren die Gefäßantworten der Arteria ophthalmica auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin (10^{-9} - 10^{-4} M) bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen ähnlich. Die Durchmesserzunahme als Reaktion auf 10^{-4} M Acetylcholin war $74 \pm 6.0\%$ bei ApoE^{-/-}- und $76 \pm 8.5\%$ bei Wildtyp-Mäusen (Abbildung 13C).

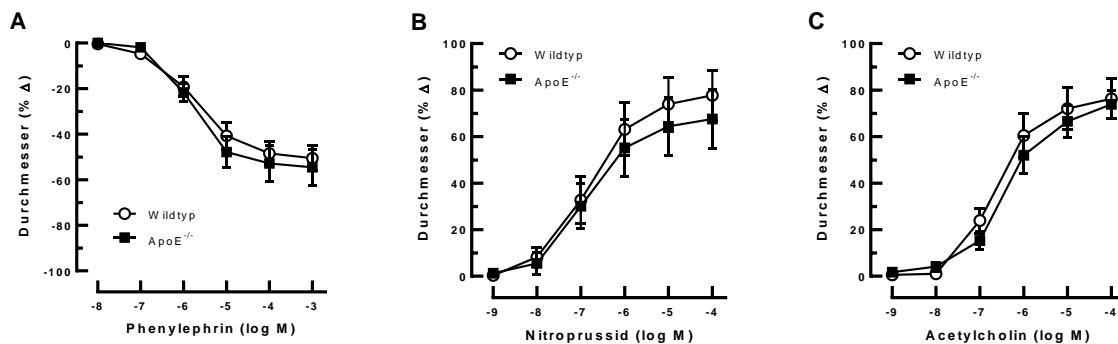


Abbildung 13 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Phenylephrin (A), Nitroprussid (B), und gegenüber Acetylcholin (C) zeigt keinen Unterschied bei beiden Maus-Genotypen. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Genotyp).

Frühere Studien haben gezeigt, dass kleine Arterien, einschließlich der Arteria ophthalmica, über Kompensationsmöglichkeiten verfügen, für den Fall einer Blockade eines vasodilatatorischen Signalweges. Solch eine Kompensation kann über die Aktivierung alternativer Signalwege, welche die vasodilatatorische Reaktion aufrechterhalten, ablaufen (115, 116).

Um zu testen, ob sich endotheliale Signalwege in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}- Mäusen veränderten, führten wir zusätzliche Experimente mit verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren durch. Nach Exposition gegenüber dem nicht-isoform-selektiven NOS-Blocker L-NAME waren reduzierte Acetylcholin-vermittelte Reaktionen auf ähnlichem Niveau bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen zu beobachten (Abbildung 14A). Bei beiden Mausgenotypen hatten weder der selektive nNOS-Inhibitor TRIM (Abbildung 14B) noch der selektive iNOS-Blocker Aminoguanidin (Abbildung 14C) eine Wirkung auf die cholinerge Ansprechbarkeit der Arteria ophthalmica.

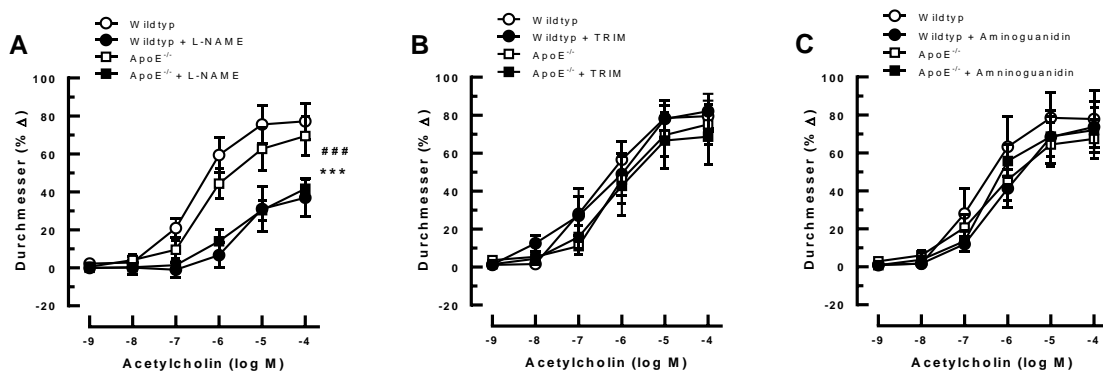


Abbildung 14 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) L-NAME (nicht-isoform-selektiver NOS Blocker), (B) TRIM (selektiver nNOS Inhibitor), und (C) Aminoguanidin (selektiver iNOS Blocker). Unter diesen drei NOS-Inhibitoren blockierte nur L-NAME die cholinerge Gefäßantwort bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen deutlich. Dies ist bezeichnend für eine Beteiligung von eNOS an der endothelabhängigen Vasodilatation. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Gruppe).

Auch die Inkubation mit Indometazin hatte keinen Einfluss auf die Reaktivität der Arteria ophthalmica gegenüber Acetylcholin (Abbildung 15A). Die kombinierte Blockade mit Indometazin und L-NAME reduzierte die cholinerge Ansprechbarkeit bei beiden Genotypen in ähnlicher Weise, wie die Inkubation mit L-NAME allein (Abbildung 15B). Dies deutet darauf hin, dass NOS und COX sich gegenseitig nicht kompensieren. Nach Zugabe von 30 mM KCl in mit Indometazin und L-NAME präinkubierten Segmenten der Arteria ophthalmica war die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation bei beiden Genotypen vernachlässigbar (Abbildung 15C), was auf eine EDHF-Beteiligung hindeutet.

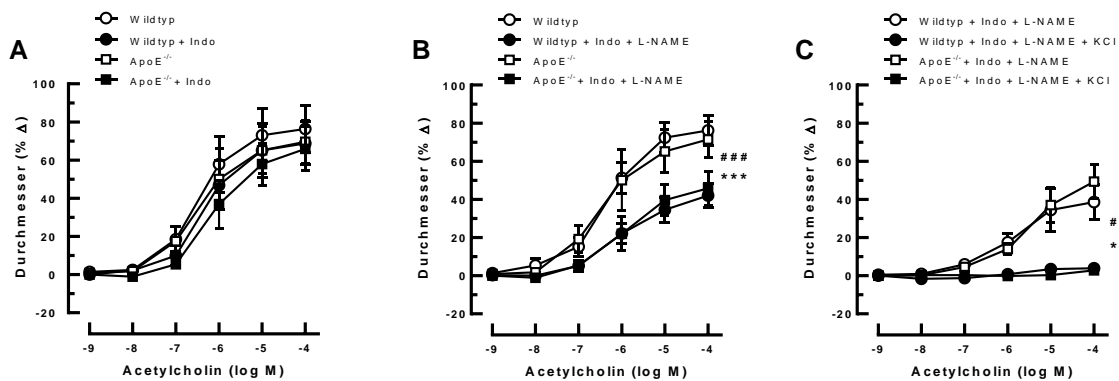


Abbildung 15 A-B-C: Die Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) Indometazin (nicht-isoform-selektiver COX-1- und COX-2-Inhibitor) zeigt keine Wirkung auf die cholinerge Vasodilatation, während die Kombination von L-NAME and Indometazin (B) vasodilatatorische Reaktionen in ähnlichem Ausmaß blockierte wie durch L-NAME allein. Der Restanteil der vasodilatatorischen Reaktivität in inkubierten Arteriensegmenten mit L-NAME und Indometazin war nach Zugabe von 30 mM KCl (C) fast vollständig aufgehoben, was für eine EDHF-Beteiligung spricht. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Gruppe; ### $P<0.001$, behandelte ApoE^{-/-} versus nicht-behandelte; *** $P<0.001$, behandelte Wildtyp-Mäuse versus nicht-behandelte).

Um die Rolle von EDHF in diesem Gefäßbett von ApoE^{-/-}-Mäusen weiter aufzuklären, wurden mehrere Blocker und Inhibitoren eingesetzt, zum Nachweis bereits identifizierter Signalwege in der Arteria ophthalmica von Mäusen (96). Erstens, die Inkubation mit 17-ODYA, einem CYP450-Blocker, reduzierte die EDHF-bedingte Reaktion auf Acetylcholin in ähnlichem Ausmaß bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen, wie in Abbildung 16A dargestellt. Außerdem waren nach Inkubation mit Baicalein, einem Blocker der 12/15-Lipoxygenase, in beiden Mausgenotypen ähnlich abgeschwächte Gefäßantworten gegenüber Acetylcholin festzustellen (Abbildung 16B). Auch der Gap Junction-Inhibitor 18 α -GA schwächte die Gefäßantwort gegenüber Acetylcholin in beiden Maus-Genotypen in einem ähnlichen Ausmaß ab (Abbildung 16C).

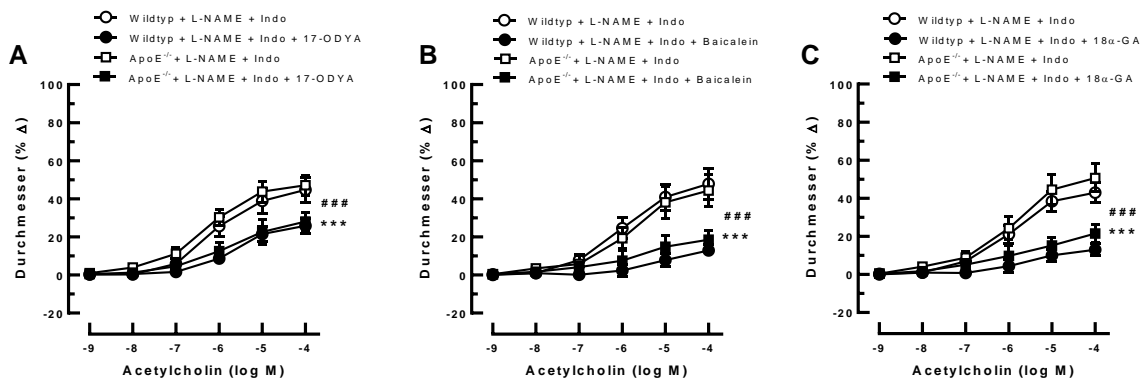


Abbildung 16 A-B-C: Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}- und bei Wildtyp-Mäusen gegenüber Acetylcholin vor und nach Inkubation mit (A) Indometazin, L-NAME und 17-ODYA, mit (B) Indometazin, L-NAME und Baicalein, und mit (C) Indometazin, L-NAME und 18 α -GA. Eine Blockade der Signalwege von CYP450- und von 12/15-Lipoxygenase mit 17-ODYA und Baicalein, sowie Blockade der Gap-Junktions mit 18 α -GA, reduzierte vasodilatatorische Antworten in ähnlichem Ausmaß wie bei inkubierten Arteriensegmenten mit L-NAME und Indometazin, bei beiden Mausgenotypen, was ein Anzeichen für eine Beteiligung dieser Signalwege an der Vasodilatation ist. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Gruppe; ### $P<0.001$, behandelte ApoE^{-/-}- versus nicht-behandelte; *** $P<0.001$, behandelte Wildtyp-Mäuse versus nicht-behandelte).

4.3 Mechanische Eigenschaften der Arteria ophthalmica

Um festzustellen, ob es bei ApoE^{-/-}-Mäusen in der Arteria ophthalmica zu einem Umbau der Gefäßwand und somit zu Veränderungen deren mechanischer Eigenschaften kommt, wurde das Verhältnis von Innen- (Abbildung 17A) und Außendurchmesser (Abbildung 17B) zum luminalen Druck bestimmt sowie das Spannungs-Dehnungs-Verhalten (Abbildung 17C) der Gefäße berechnet. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und ApoE^{-/-}-Mäusen festgestellt, was darauf hindeutet, dass es zu keinem Umbau der Gefäßwand in der Arteria ophthalmica gekommen ist.

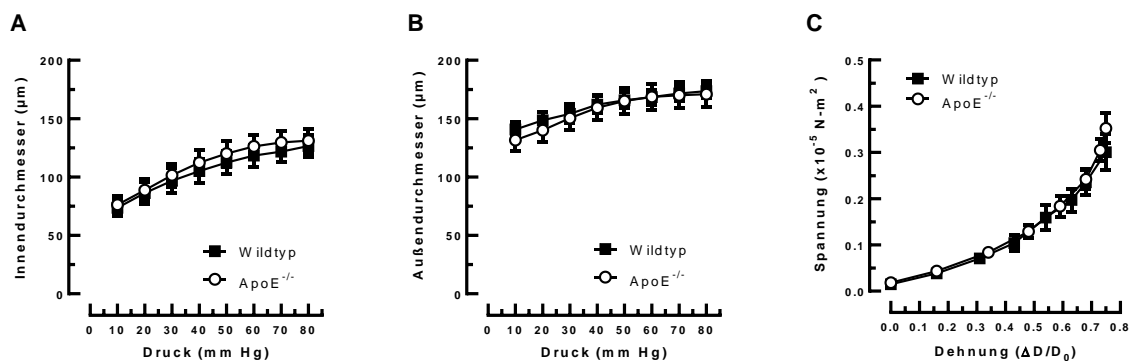


Abbildung 17 A-B-C: Bestimmung der Verhältnisse von Innen (µm)- (A) und Außendurchmesser (µm) (B) zum luminalen Druck (mmHg), sowie des Spannung (in $\times 10^{-5}$ N·m⁻²)-Dehnung (in $\Delta D/D_0$)-Verhaltens (C) in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Die maximale Gefäßrelaxation der Arteria ophthalmica wurde durch EDTA erzielt, indem die glatte Muskelschicht inaktiviert wurde, um eine Gefäßumwand zu prüfen. Es wurden keine Differenzen in Innen- und Außendurchmesser zum luminalen Druck festgestellt, sowie keine Unterschiede in Spannungs-Dehnungs-Verhalten der Gefäße gezeigt. Daher kein Zeichen von Gefäßumwand in folgend der Hypercholesterinämie bei ApoE^{-/-}- Mäusen konnte nachgewiesen werden.

4.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Färbung der Aortenquerschnitte mit DHE ergab eine deutlich erhöhte Leuchtintensität in der Gefäßwand von ApoE^{-/-}-Mäusen, was ein Anzeichen für eine erhöhte ROS-Konzentration ist ($P < 0.01$, ApoE^{-/-}- versus Wildtyp-Mäuse) (Abbildung 18A). Im Gegensatz dazu konnte keine Differenz bei Leuchtintensität in der Arteria ophthalmica zwischen ApoE^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 18B).

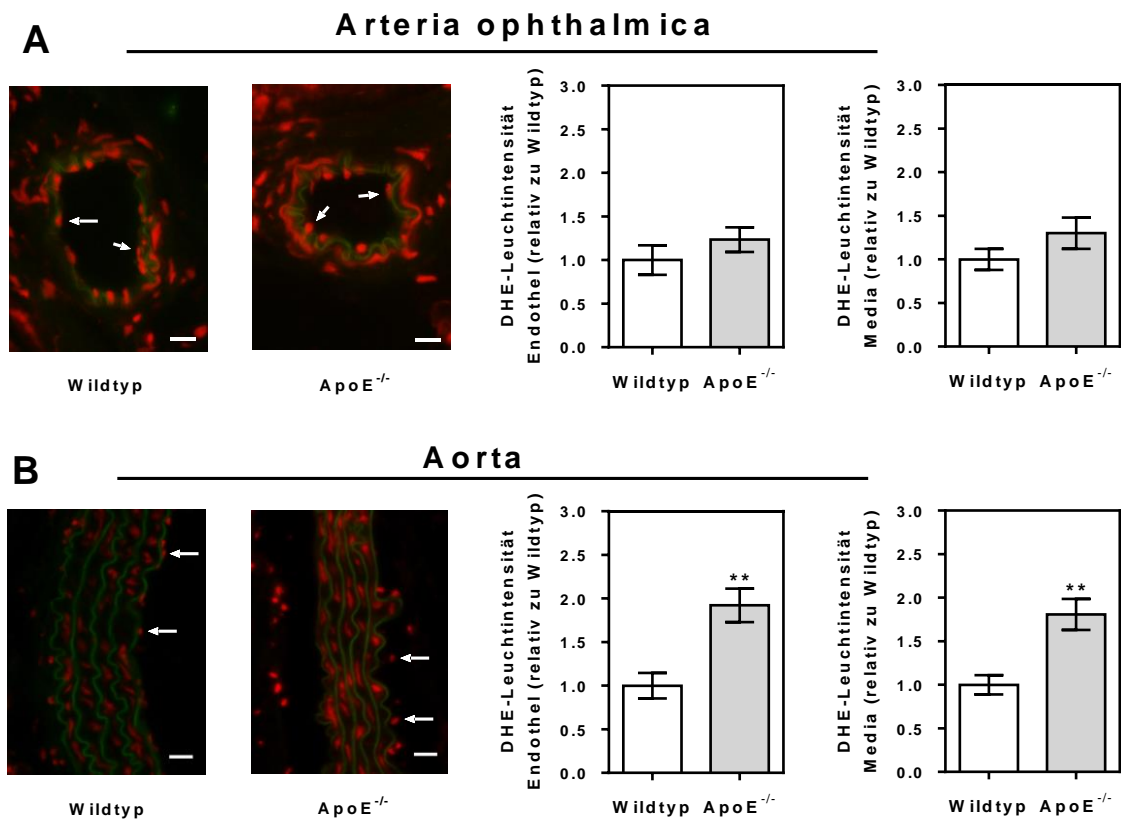


Abbildung 18 A-B: Die DHE-Färbungsintensität (rot) war deutlich erhöht in der Gefäßwand der Aorta (A), jedoch nicht in der Arteria ophthalmica (B). Es wird für jedes Gefäßbett und Mausgenotyp eine repräsentative Fotografie dargestellt, als zusammengefügtes Bild der DHE-Färbung und der Autofluoreszenz der Lamina elastica (grün), um die Lokalisierung der Zellen einschließlich der Gefäßwand zu visualisieren. Die Daten sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8$ pro Konzentration und Genotyp; ** $P < 0.01$, ApoE^{-/-} versus Wildtyp-Mäuse). Maßstabsleiste = 20 μ m.

4.5 Quantifizierung der Expression von Redoxenzymen

Unter den drei NOX-Isoformen (NOX1, NOX2, NOX4) und die XDH/XO, bei denen bereits nachgewiesen wurde, dass sie in den lipoprotein-bedingten pathologischen Zuständen der Aorta beteiligt sind, war das Expressionsniveau von NOX4-mRNA bei ApoE^{-/-}-Mäusen bis zu 15-fach erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (P<0.001; Abbildung 19A). Im Gegensatz dazu wurden keine signifikanten Differenzen in den mRNA-Expressionslevel der vier prooxidativen Redoxgenen zwischen der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen, wie in der Abbildung 19B dargestellt. Um die Expression der Redoxenzymen auf Protein-Ebene zu bestimmen und um sie in der Gefäßwand zu lokalisieren, wurden Immunfärbungen durchgeführt. Interessanterweise wurden ausgeprägte Expressionen von NOX1 und NOX2 im vaskulären Endothel der Aorta bei ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen, wobei die NOX4 Expression nicht im Endothel, sondern nur in der glatten Muskelschicht erhöht war.

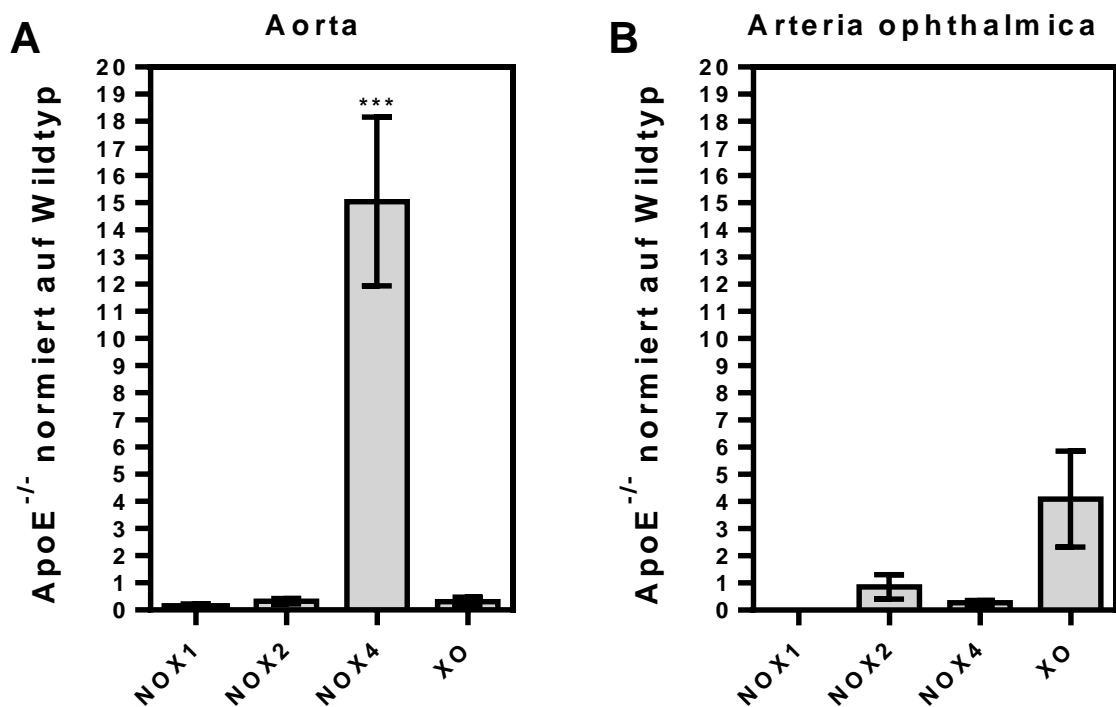
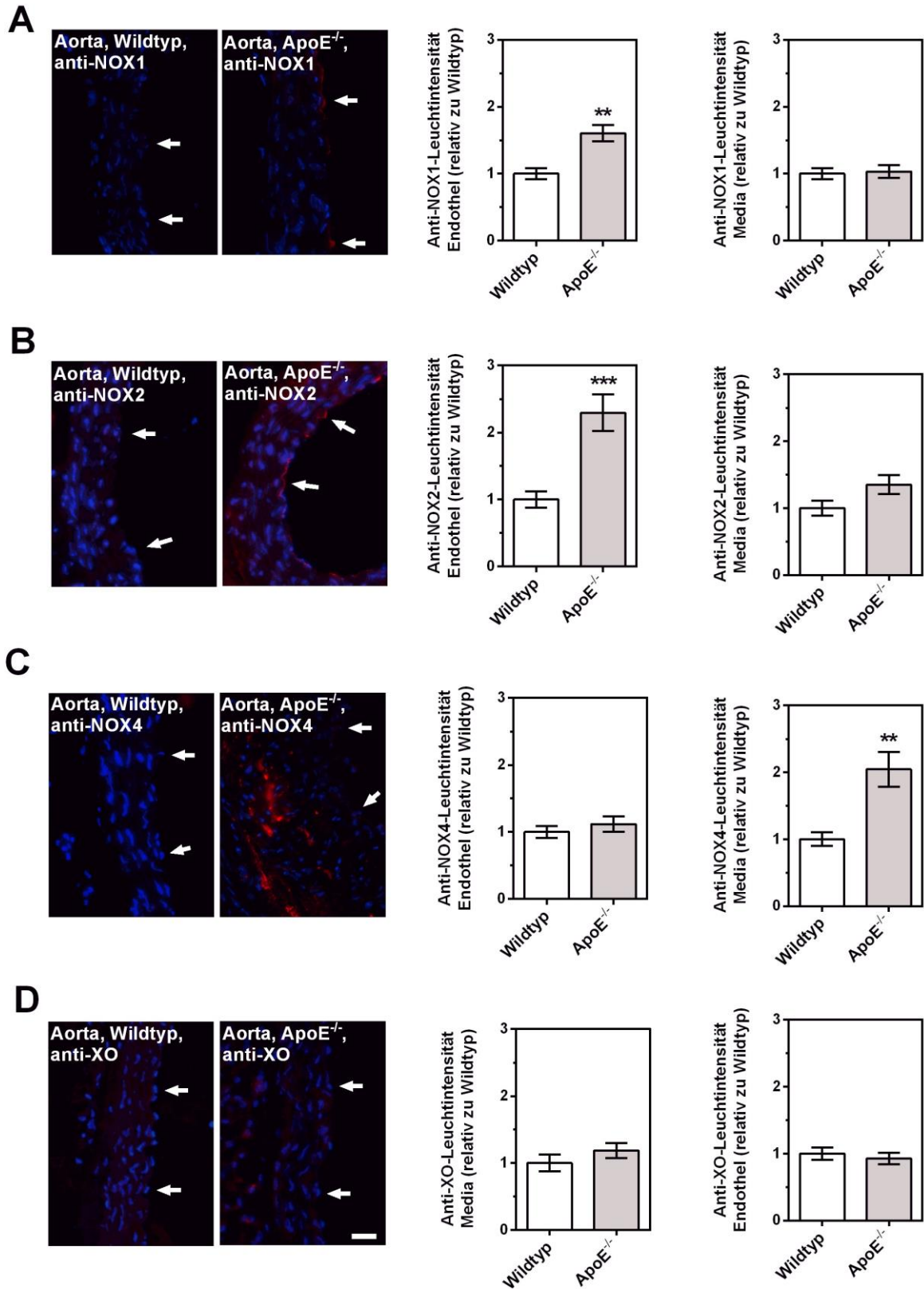


Abbildung 19 A-B: Boten-RNA (mRNA) Expression für prooxidative Redoxenzymen NOX1, NOX2, NOX4 und XO in der Aorta (A) und in der Arteria ophthalmica (B) als Fold-change (Mittelwert \pm SE) bei ApoE^{-/-}-Mäusen versus Wildtyp-Mäuse angegeben (bei der Aorta, n=8 und bei der Arteria ophthalmica n=6; ***P < 0.001, ApoE^{-/-} versus Wildtyp-Mäuse).

Bemerkenswerterweise wurden bei der Expression von prooxidativen Enzymen keine deutlichen Differenzen zwischen der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen ermittelt.



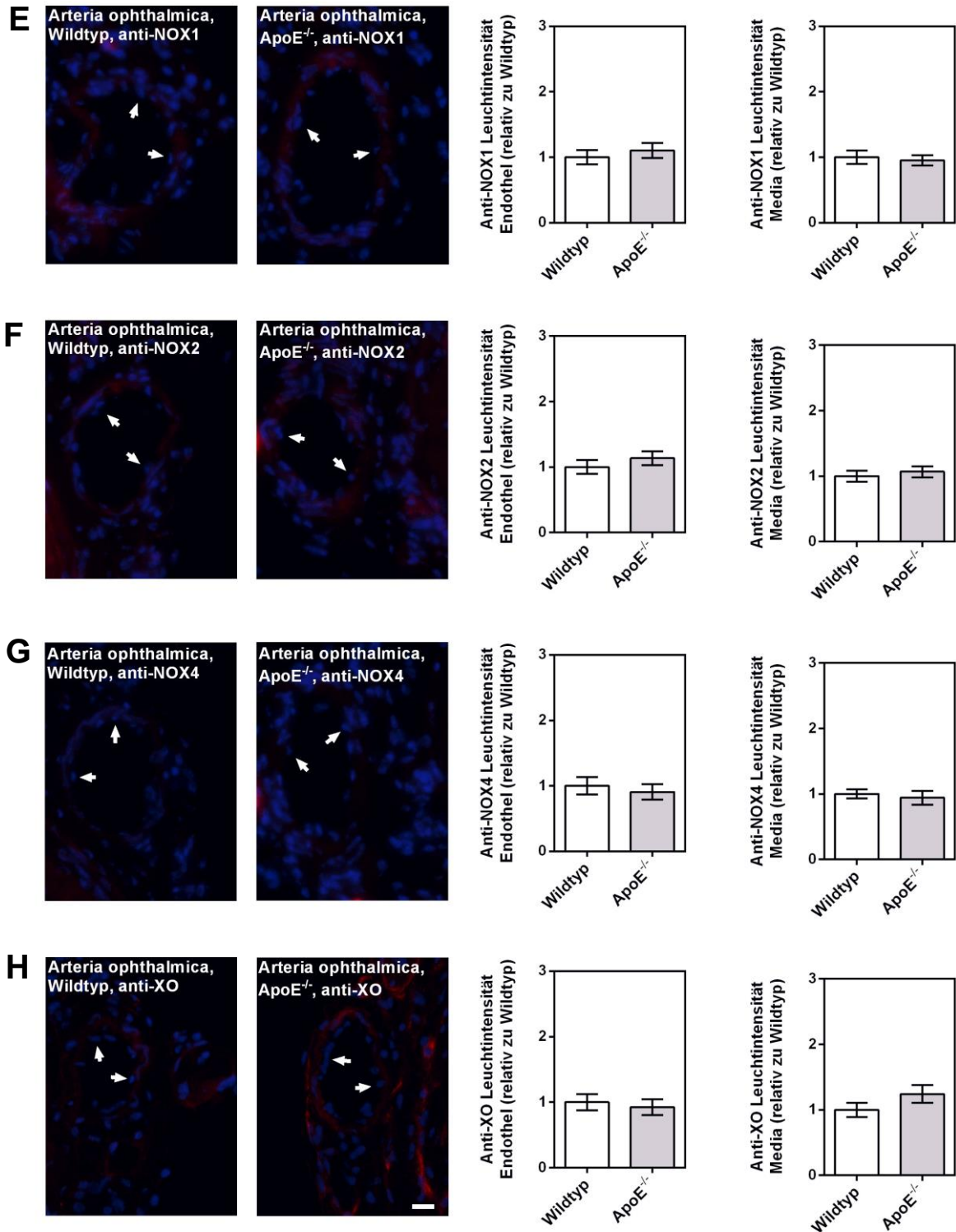


Abbildung 20 A-B-C-D-E-F-G-H: Darstellung der Expression von Redoxenzymen NOX-1, NOX-2, NOX-4, XO auf Proteinebene mittels Immunofärbungen bei der Aorta abdominalis und bei der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen. Es wurden ausgeprägten Expressionen von NOX1 und NOX2 im Endothel der Aorta bei ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen, wobei die NOX4 Expression nicht im Endothel sondern in der glatten Muskelschicht erhöht war. Zwischen der Arteria ophthalmica von Wildtyp-Mäusen und von ApoE^{-/-}-Mäusen wurden jedoch keine deutlichen Differenzen bei der Expression von prooxidativen Enzymen beobachtet. Blau: DAPI ; Rot: Rhodamin Red-X-Färbung. Maßstabsleiste = 20 μ m.

4.6 Quantifizierung der Expression von LOX1-Rezeptor

Die Expression des LOX-1 Rezeptors war in der Gefäßwand der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen erhöht. Die Immunantwort auf LOX-1 war im Endothel und in der subendothelialen glatten Muskelschicht der Aorta besonders ausgeprägt (Abbildung 20A). Im Gegensatz dazu war die Immunantwort auf LOX-1 in der Aorta sehr schwach bei Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz zur Aorta war in der Arteria ophthalmica beider Versuchstiergruppen praktische keine Immunreaktivität im Endothel zu erkennen. Die Media beider Mausgenotypen war hingegen eine Immunreaktivität ähnlicher Ausprägung zu erkennen (Abbildung 20B).

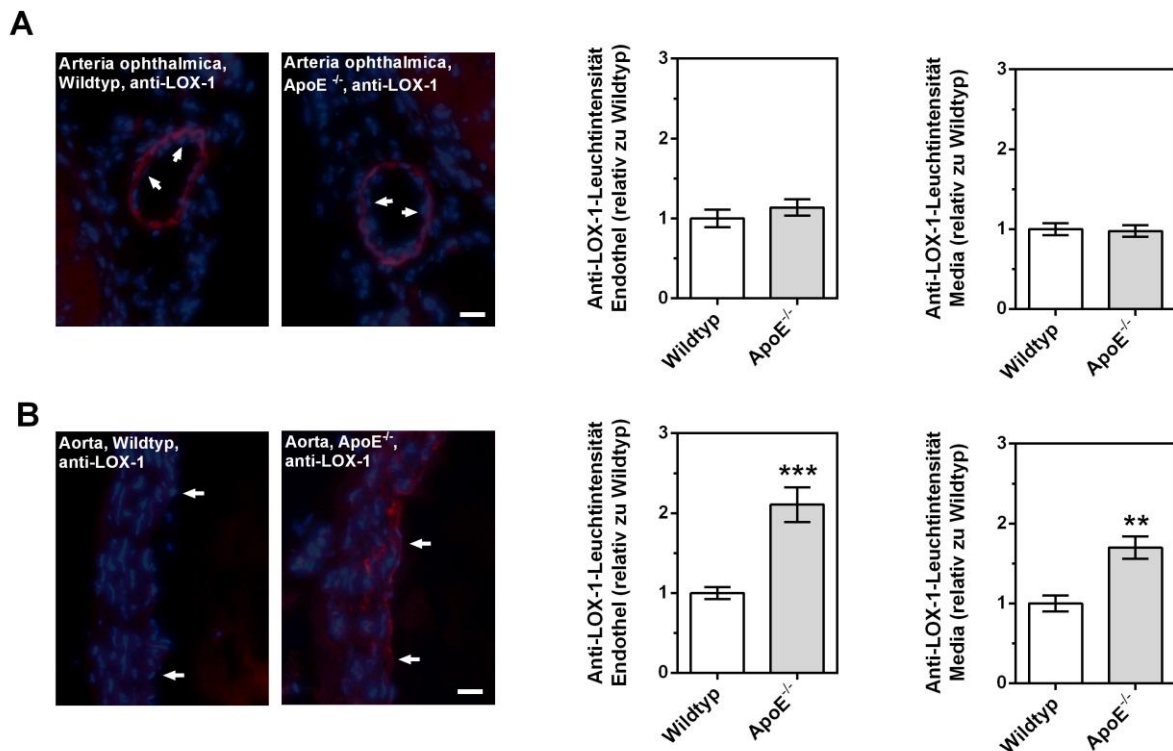


Abbildung 21 A-B: Darstellung der Expression von Redoxenzymen LOX-1 Rezeptor auf Proteinebene mittels Immunfärbungen in der Aorta abdominalis und in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen. Die weißen Pfeile deuten auf die Endothelzellenschicht. In der Aorta (A) war besonders erhöht die Expression von LOX-1 Rezeptor im Endothel und in der glatten Muskulatur, während in der Arteria ophthalmica (B) war seine Expression sowohl im Endothel als auch in der glatten Muskulatur sehr gering. Blau: DAPI ; Rot: Rhodamin Red-X-Färbung. Maßstabsleiste = 20 μ m.

5. Diskussion

5.1 Zentrale neue Erkenntnisse der Studie

Das Hauptziel dieser Arbeit war es die Hypothese zu prüfen, dass sich in der Arteria ophthalmica von hypercholesterinämischen Mäusen eine endotheliale Dysfunktion entwickelt.

Zusammengefasst ergab die Studie folgende wichtige Erkenntnisse:

1. Im Gegensatz dazu zeigten Aortensegmente eine beeinträchtigte vasodilatatorische Antwort auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin, erhöhte Expressionsniveaus von ROS sowie eine gesteigerte Expression von NOX2, NOX4, LOX-1 in der Gefäßwand, was auf oxidative Gefäßwandveränderungen hindeutet.
2. Die Arteria ophthalmica von zwölf Monate alten ApoE^{-/-}-Mäusen wies keine Anzeichen einer endothelialen Dysfunktion auf. Zudem unterschieden sich die vaskuläre ROS-Konzentration sowie die Expressionsniveaus prooxidativer Enzyme und des LOX-1-Rezeptors zwischen ApoE^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nicht. Auch die mechanischen Eigenschaften der A. ophthalmica waren bei ApoE^{-/-}-Mäusen nicht verändert.
3. Die Beteiligung von Signalwegen an der endothelabhängigen Vasodilatation unterschied sich nicht zwischen der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen, was darauf hindeutet, dass keine Ausgleichmechanismen bei ApoE^{-/-}- Mäusen aktiviert wurden, um die endothelabhängige Vasodilatation zu erhalten.

5.2 Vergleich eigener Ergebnisse mit dem aktuellen Forschungsstand

5.2.1 Literaturstand über den Einfluss von oxLDLs auf das Endothel

Bei Hypercholesterinämie lösen oxLDLs die Expression prooxidativer Enzyme in der Gefäßwand aus, die zur Entstehung von ROS führt, welche in hoher Konzentration eine endotheliale Dysfunktion hervorrufen, teils durch Beeinträchtigung der eNOS-Funktion und teils durch Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) (66, 117-119).

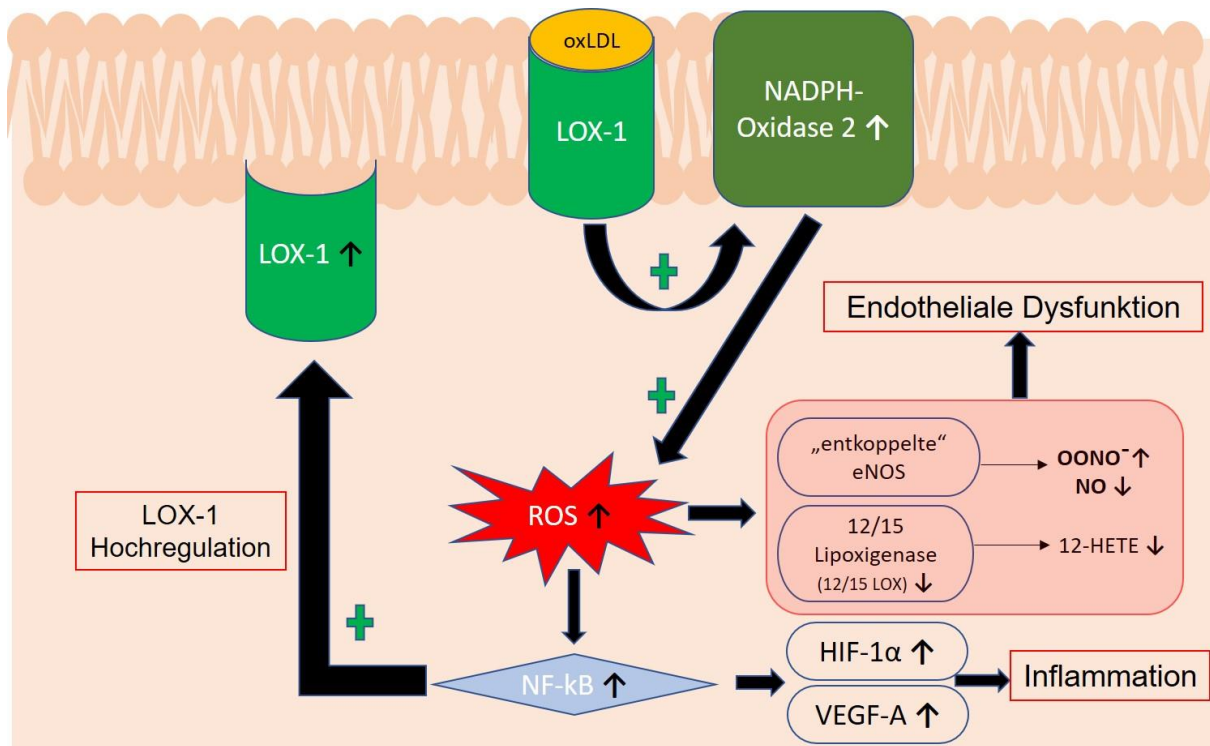


Abbildung 22: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene in retinalen Arteriolen der ApoE^{-/-}-Maus, durch eine Aktivierung des LOX-1 Rezeptors aufgrund erhöhter oxLDL-Level bei Hypercholesterinämie. Durch die LOX-1-induzierte Kaskade wird die NADPH-Oxydase 2 (NOX2) aktiviert und darauffolgend entsteht die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Daraufhin lösen ROS die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB aus, der induziert die mRNA LOX-1 Hochregulation und die Immunantwort durch Zytokine wie HIF-1α und VEGF-A. Zudem wird durch die ROS-Entstehung die eNOS- und 12/15 Lipoxigenase-Funktion beeinträchtigt: insbesondere bei eNOS findet eine sogenannte „Entkopplung“ statt, indem dieses Enzym in Gegenwart von ROS, nicht mehr mit Tetrahydrobiopterin (BH4), sondern mit BH2 (7,8-dihydrobiopterin) assoziiert ist, sodass statt Stickstoffmonoxide (NO) eine radikale Sauerstoffspezies wie Peroxynitrit-Anion (OONO⁻) produziert wird.

Es wurde über beeinträchtigte Reaktionen auf endothelabhängige Vasodilatoren sowohl in großen als auch in kleine Arterie von Patienten mit Hypercholesterinämie berichtet (120-124). In der menschlichen Retina, bemerkenswerterweise reduzierten sich vaskuläre hyperämische Antworten auf Flickerlichtstimulation mit steigendem Serumcholesterinspiegel, auch innerhalb des physiologischen Autoregulationsbereichs (8, 9). Ebenso wurde beschrieben, dass ApoE^{-/-}-Mäuse eine endotheliale Dysfunktion sowohl in großen als auch in kleinen Gefäßen entwickeln, einschließlich retinaler Arteriolen (54, 97, 125-127).

Jedoch gab es auch Berichte über Experimente an kleinen Arterien von Tiermodellen und Menschen mit Hypercholesterinämie, die keine Beeinträchtigung der endothelialen Funktion entwickelten. Beispielsweise blieb in isolierten Mesenterialarterien von ApoE^{-/-}-Mäusen die endothelabhängige Gefäßrelaxationen gegenüber Acetylcholin intakt oder verbesserte sich sogar (115). In einem anderen Modell für Dyslipidämie wurde ebenfalls die EDHF-induzierte Reaktivität der Arterien des Musculus gracilis gegenüber Acetylcholin verstärkt nachgewiesen (128). Ebenso blieb die endothelabhängige Vasodilatation in Arteriolen des Cremaster-Muskels von ApoE^{-/-}- und LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen erhalten (129). In menschlichen gastroepiploischen Arterien reduzierte eine Hypercholesterinämie die Reaktivität in großen, allerdings nicht in kleinen Gefäßen (130).

5.2.2 Endotheliale Signalmechanismen in der Arteria ophthalmica

Jedoch ist noch nicht bekannt, weshalb die endothelabhängige Vasodilatation kleiner Arterien durch Hypercholesterinämie kaum beeinträchtigt ist. Mögliche Erklärungen sind eine reduzierte Aufnahme von OxLDLs durch die endothelialen Zellen, eine Resistenz intrazellulärer prooxidativer Signalwege gegen eine Aktivierung durch OxLDLs, eine erhöhte intrazelluläre antioxidative Aktivität oder alternative Signalwege, die weniger anfällig gegenüber den Effekten der Hypercholesterinämie sind. Beispielsweise wurde vermutet, dass hochleitfähige calciumaktivierte Kaliumkanäle (BK_{Ca}) in der Lage sind, EDHF-vermittelte vasodilatatorische Antworten in Mesenterialarterien von ApoE^{-/-}-Mäusen zu erhalten (115). In einer anderen Studie an Arterien des Musculus gracilis von Mäusen mit Dyslipidämie ist eine kompensatorische Funktion von CYP450-Metaboliten der Arachidonsäure vorgeschlagen worden (128).

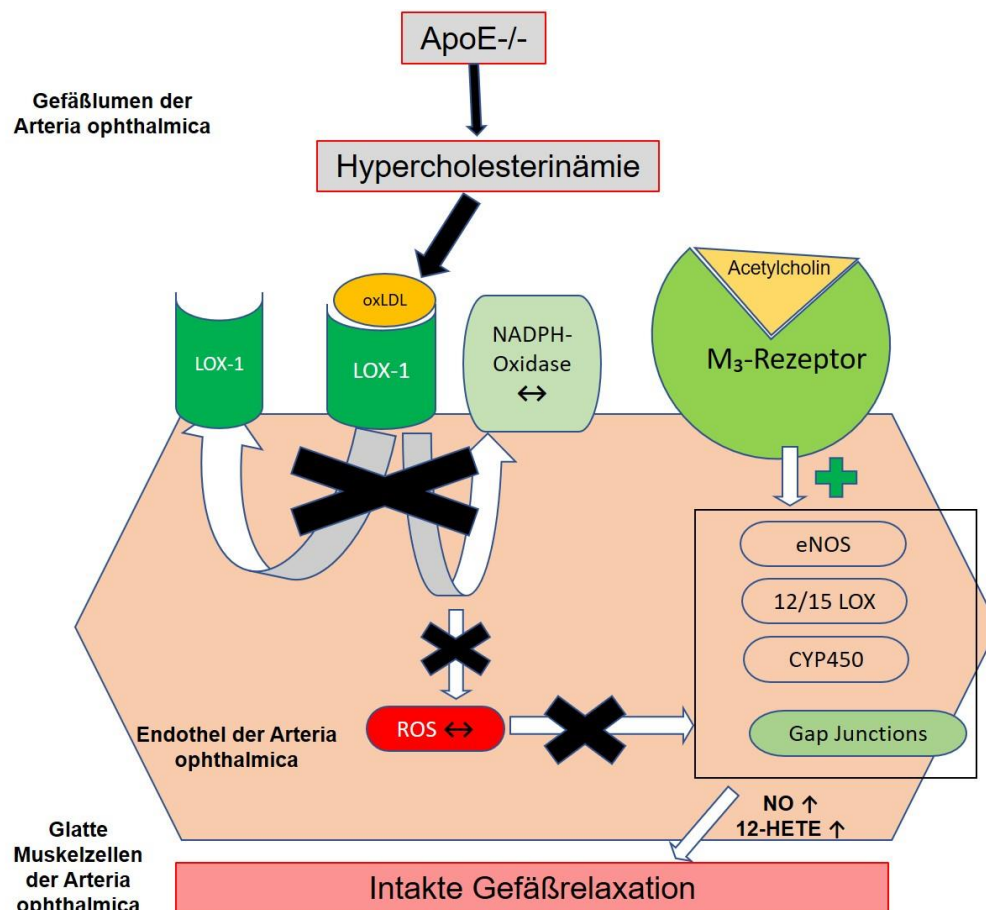


Abbildung 23: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene in der Arteria ophthalmica der ApoE^{-/-}-Maus. Interessanterweise konnten in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen keine Überexpression der LOX-1 im Vergleich zu Wildtypkontrollen sowie keine verstärkte ROS-Produktion nachgewiesen werden. Aufgrund der fehlenden ROS-Entstehung werden die endothelabhängigen vasodilatatorischen Mechanismen nicht beeinträchtigt, so dass keine endotheliale Dysfunktion induziert wird.

Frühere Studien aus unserem Labor zeigten, dass, vasodilatatorische Reaktionen auf Acetylcholin in der Arteria ophthalmica von Mäusen über M₃-Acetylcholinrezeptoren und

mehrere endothelabhängige Mechanismen, wie eNOS, Lipoxigenase- und CYP450-Metaboliten, einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle (Kir) und Gap Junctions vermittelt werden (96, 107, 131, 132).

Bei chronischer eNOS-Defizienz wurden hingegen endothelabhängige, vasodilatatorische Reaktionen zwar aufrechterhalten, aber durch Signalwege vermittelt, an denen die Lipoxigenase und Kir-Kanäle mitbeteiligt sind, jedoch nicht CYP450-Metaboliten und Gap Junctions, was darauf hindeutet, dass die Arteria ophthalmica der Maus über mehrere Signalwege verfügt, die zur Erhaltung der endothelabhängigen Vasodilatation beitragen könnten falls ein Signalweg fehlt (116).

In der vorliegenden Arbeit trugen eNOS-Metaboliten in ähnlichem Ausmaß zur cholinergen endothelabhängigen Vasodilatation in der Arteria ophthalmica in beiden Maus-Genotypen bei, was darauf hindeutet, dass eNOS in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen nicht dysfunktional war. Zudem gab es keinen Hinweis darauf, dass alternative Signalwege in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen aktiviert worden waren, da eine Blockade von nNOS, iNOS, COX, Lipoxigenase, CYP450 und Gap Junctions eine ähnliche Wirkung auf die endothelabhängige Vasodilatation zeigte wie bei Wildtyp-Mäusen. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass eine alleinige Hypercholesterinämie keinen wesentlichen Einfluss auf die endotheliale Funktion in der Arteria ophthalmica ausübt, was im Gegensatz zu unseren zuvor publizierten Ergebnissen in retinalen Arteriolen steht (54).

Für unsere Studien verwendeten wir ApoE^{-/-}-Mäuse, da diese ein etabliertes Maus-Modell darstellen, das eine schwere spontane Hypercholesterinämie sowie erhöhte vaskuläre ROS- und Zytokin-Level, eine endotheliale Dysfunktion und atherosklerotische Schädigungen vergleichbar zu menschlichen Arterien entwickeln (13, 97, 125). In der aktuellen Studie hatten ApoE^{-/-}-Mäuse erhebliche erhöhte ROS-Level und eine reduzierte endotheliale Funktion in der Aorta, was in Einklang mit früheren Studien steht (15, 133). Interessanterweise wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Aorta keine Erhöhung der ROS-Level in der Arteria ophthalmica nachgewiesen.

In unserer Studie war auch in Wildtyp-Mäusen keine wesentliche LOX-1-Expression in der Arteria ophthalmica nachweisbar, was darauf hindeuten kann, dass spezifische Regulationsmechanismen der LOX-1-Expression, wie zum Beispiel ihre Hochregulation infolge einer Hypercholesterinämie, nicht vorhanden sind. Interessanterweise zeigten Senn et al. in hypercholesterinämischen Patienten, dass in Nagelbett-Kapillaren der Finger eine verminderte Blutflussgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt wurde, während keine Unterschiede in der Blutzirkulation bei retrobulbären Gefäßen zwischen Patienten und Kontrollen feststellbar waren, was bedeuten könnte, dass eine Hypercholesterinämie keinen Einfluss auf die Reaktivität der Arteria ophthalmica hat (134).

Darüber hinaus demonstrierten Zadeh et al. in einem Lipopolysaccharid (LPS)-bedingten akuten Atemnotsyndrom (*engl.* acute respiratory distress syndrome, ARDS) am Schweine-Modell, dass retinale Arteriolen eine endotheliale Dysfunktion entwickeln, Ziliararterien jedoch nicht (135), übereinstimmend mit der Hypothese, dass retrobulbäre Arterien möglicherweise stressresistenter als retinale Gefäße sind.

Hingegen weist eine frühere Untersuchung aus unserem Labor an Mäusen, bei denen Angiotensin II (Ang II) verabreicht wurde, dass die Arteria ophthalmica eine endotheliale Dysfunktion entwickeln kann, allerdings durch den Ang II-Typ 1 Rezeptor (AT1-Rezeptor) und eine darauffolgende Aktivierung von NOX2 (55).

Möglicherweise ist die gezeigte Stressresistenz der A. ophthalmica gegenüber einer Hypercholesterinämie ein Resultat einer physiologisch minimalen oder sogar fehlenden Expression des LOX-1-Rezeptors. Diese Hypothese könnte erklären, warum der Zustand einer Hypercholesterinämie, keinen feststellbaren Einfluss auf die Reaktivität der A. ophthalmica hat, welche in der vorliegenden Studie eine intakte Gefäßrelaxation zeigt, im Gegensatz zu retinalen Arteriolen, wo eine endotheliale Dysfunktion nachzuweisen war (54).

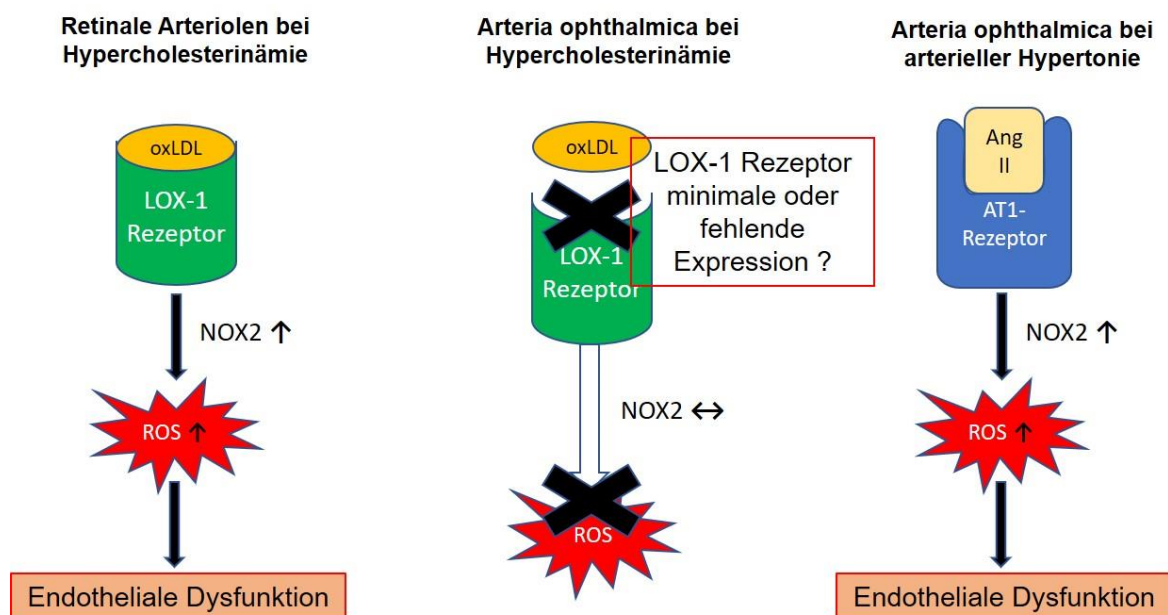


Abbildung 24: Vergleich der unterschiedlichen Auswirkungen einer Hypercholesterinämie zwischen retinalen Arteriolen und Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}-Mäusen, sowie einer arteriellen Hypertonie bei Mäusen, in welchen durch eine Verabreichung von Angiotensin II, eine Hypertension ausgelöst wurde. Interessanterweise war aufgrund einer Hypercholesterinämie in der Arteria ophthalmica keine endotheliale Dysfunktion nachzuweisen, während bei Hypertonie, durch den AT1-Rezeptor und folgende Aktivierung von NOX-2, konnte eine endotheliale Dysfunktion festgestellt werden.

5.2.3 NOX1, NOX2 und NOX4 lösen unterschiedliche Effekte in der Aorta aus

Es wurde bereits beschrieben, dass die prooxidativen Enzyme NOX und XDH/XO zur vaskulären Schädigung bei Hypercholesterinämie von ApoE^{-/-}-Mäusen beitragen (136-138). Jedoch wird die Bedeutung von individuellen NOX-Isoformen für Atherosklerose heftig diskutiert. Während für NOX1 und NOX2 überwiegend gezeigt wurde, dass sie zu atherosklerotischen Schäden führen, wird die Rolle von NOX4 kontrovers diskutiert (138, 139). Obwohl manche Studien hinter dem Konzept stehen, dass NOX4 ein Auslöser der Atherosklerose bei Hypercholesterinämie ist, haben andere Arbeitsgruppen über gegensätzliche Ergebnisse berichtet (140-145).

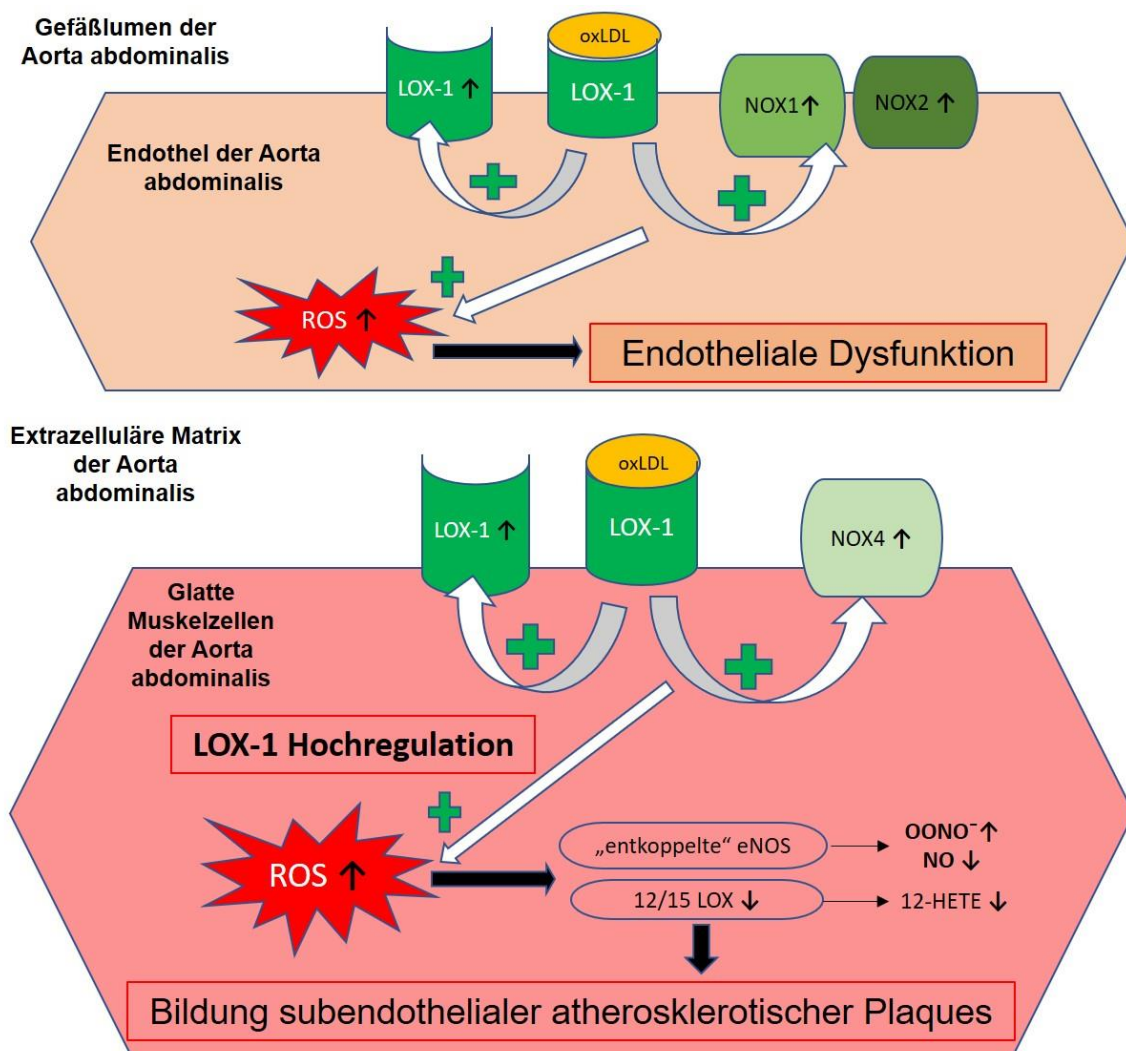


Abbildung 25: Übersicht zellulärer Veränderungen auf Endothelebene und auf Glattmuskelebene in der Aorta abdominalis der ApoE^{-/-}-Maus. Bemerkenswerterweise war die erhöhte Expression von NOX1 und NOX2 entscheidend für die ROS-Entstehung auf Endothelebene und verantwortlich für die endotheliale Dysfunktion, jedoch nicht im Gefäßmuskel; hier war dagegen die Erhöhung der Expression und der Aktivität von NOX4 nachzuweisen, während das Expressionsniveau von NOX1 und NOX2 nicht erhöht war. Wahrscheinlich ist NOX4 verantwortlich für die Bildung subendothelialer atherosklerotischer Plaques bei glatten Muskelzellen.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die NOX4-mRNA-Expression bis um das 15-fache höher war in der Aorta abdominalis von ApoE^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren, während sich NOX1-, NOX2- und XO-Level nicht unterschieden. Aus früheren Studien ist bekannt, dass ApoE^{-/-}-Mäuse mit westlicher Ernährungsweise nach 3-4 Monaten fortgeschrittene vaskuläre Läsionen entwickeln (13). Da ApoE^{-/-}-Modelle in der vorliegenden Untersuchung eine dauerhafte Hypercholesterinämie durch das fortgeschrittene Alter aufzeigten, kann unser Modell auch als Beispiel eines fortgeschrittenen atherosklerotischen Stadiums betrachtet werden.

Somit sind unsere mRNA-Befunde der Aorta im Einklang mit Studien aus anderen Laboren, welche darauf hinweisen, dass NOX4 zu vaskulärer Schädigung unter langfristigen hyperlipidämischen Bedingungen und fortgeschrittenen Atherosklerose in Mäusen und Menschen beiträgt (144-146). Da die NOX4 in Aortensegmenten nur in der Muskelschicht, nicht jedoch im Endothel von ApoE^{-/-}-Mäusen hochreguliert war, hat sie wahrscheinlich eine Hauptrolle in der Bildung des Atheroms (146), jedoch nicht bei der endothelialen Dysfunktion. Auf Endothelebene deuten unsere Ergebnisse dagegen auf eine Beteiligung der NOX1 und NOX2 hin. In Berücksichtigung des gesamten Aortengewebes, das homogenisiert wurde, nimmt das Endothel einen geringeren Anteil im Vergleich zu der glatten Muskelschicht ein. In Bezug auf die Schichten in der Gefäßwand der menschlichen Aorta abdominalis wurde es zum Beispiel beschrieben, dass im Durchschnitt die Tunica intima (bestehend aus Endothel, Basalmembran und subendotheliales Gewebe) eine Dicke von ca. 0,12 mm aufweist, während die Tunica media (bestehend aus glatter Muskelschicht und einem Netz von

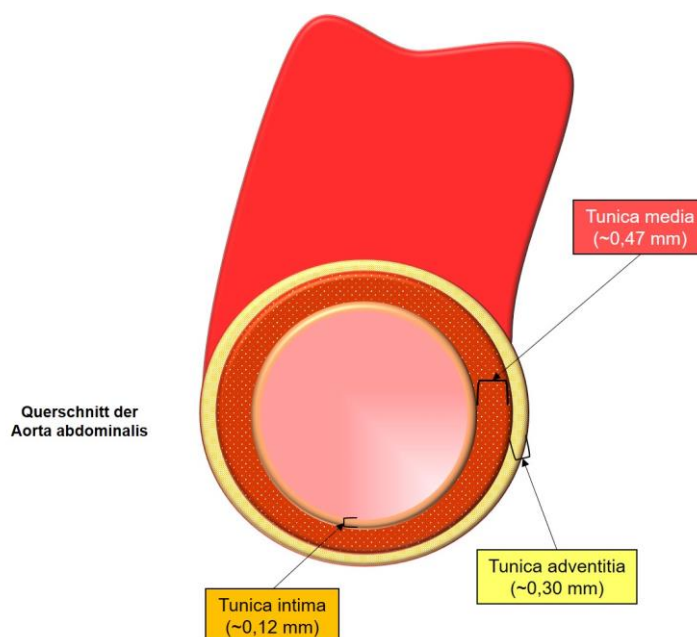


Abbildung 26: Darstellung der Gefäßwand in der menschlichen Aorta abdominalis nach (148). Bemerkenswerterweise zählt das Endothel für wenig mehr als ein Zehnte der gesamten Gefäßwand der Aorta, während die Hälfte ist durch die glatte Muskelschicht repräsentiert, und die Tunica adventitia mit ihren Nerven und Vasa Vasorum nimmt zirka ein Drittel der Gefäßwand ein.

Kollagen- und Elastin- Fibrillen) ca. 0,47 mm (um 3 bis 4-fach das Endothel), und die Tunica Adventitia (bestehend aus Bindegewebe, Nerven und Gefäßen, die so genannte Vasa Vasorum, der Aorta) ca. 0,30 mm (147, 148).

Der relevante Unterschied in dem Anteil der Gefäßwandschichten und eine nur regional begrenzte Überexpression von NOX1 und NOX2 könnten die fehlende mRNA-Überexpression im Gesamthomogenisat der Aorta erklären.

Bemerkenswerterweise zeigte keines der getesteten prooxidativen Enzyme erhöhte mRNA-Expressionsniveaus in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen, was mit der unveränderten ROS-Konzentration und den erhaltenen endothelialen Signalwegen in Einklang steht. Da trotz erheblicher Veränderungen in der Aorta keine funktionellen und morphologischen Veränderungen in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden konnten, vermuten wir, dass das LOX-1-Rezeptor-Signal verantwortlich für den Unterschied zwischen den zwei Gefäßbetten sein könnte. Frühere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die LOX-1-Expression (und deren Translokation in die Zellmembran) selbst durch oxLDL in Geweben oder Gefäßen ausgelöst werden kann (118). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stellten wir fest, dass die LOX-1-Expression tatsächlich in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen hochreguliert ist. In der Arteria ophthalmica dagegen konnte ein solcher Beweis für die LOX-1-Hochregulation von ApoE^{-/-}-Mäusen nicht gefunden werden, was eine mögliche Erklärung für die Resistenz dieser Gefäße gegen chronische Hypercholesterinämie sein könnte.

5.3 Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse stützen eine frühere Studie an Menschen, die keine Differenzen in retrobulbären Blutflussgeschwindigkeiten zwischen Patienten mit Hypercholesterinämie und Kontrollprobanden aufgezeigt hat, obwohl unterschiedliche Blutflussgeschwindigkeiten von Finger-Nailfold-Kapillaren festgestellt werden konnten (134). Beide Studien zeigen auf, dass die retrobulbäre Gefäßfunktion widerstandsfähiger gegenüber erhöhten atherogenen Lipoproteinen sein könnte, als andere Gefäßbetten.

Interessanterweise zeigten menschliche retinale Blutgefäße eine reduzierte vasodilatatorische Reaktion bei hohem Cholesterinspiegel (8, 9). Jedoch bestehen diverse anatomischen und funktionalen Differenzen zwischen retrobulbären und retinalen Blutgefäßen, z.B. Innervation durch autonome Nervenfasern, sowie Autoregulation als auch endothelabhängige Vasodilatation und Kompensationsmechanismen (96, 149-152). Somit sind Unterschiede möglich, hinsichtlich der Anfälligkeit der endothelialen Zellen gegenüber erhöhtem Cholesterinspiegel, zwischen retrobulbären Blutgefäßen und retinalen Arteriolen.

Zusammenfassend war die endotheliale Funktion in der Aorta von ApoE^{-/-}-Mäusen beeinträchtigt, aufgrund eines erhöhten oxidativen Stresslevels, vermutlich durch die Beteiligung von NOX1 und NOX2, während wahrscheinlich NOX4 eine wesentliche Rolle bei der Bildung atherogener Plaques in der glatten Muskelschicht spielt. Im Gegensatz dazu war die endotheliale Funktion in der Arteria ophthalmica von ApoE^{-/-}-Mäusen erhalten, und keine Veränderungen in den cholinergischen vasodilatatorischen Signalwegen, ROS- und prooxidativen Redoxgenen-Level in diesem Gefäßbett wurden beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, im Gegensatz zu einigen anderen kleinen Blutgefäßen, die Funktion der Arteria ophthalmica von Mäusen resistent gegenüber Apolipoprotein E Defizienz ist.

Tabelle 4: Übersichtstabelle unserer Ergebnisse und Vergleich zwischen Verhältnisse der Arteria ophthalmica und der Aorta abdominalis

	Verhältnis der Arteria ophthalmica von ApoE ^{-/-} - Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	Verhältnis der Aorta abdominalis von ApoE ^{-/-} - Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen
Gefäßantwort	intakt , nachweisbare cholinergische Gefäßrelaxation	reduzierte Reaktivität gegenüber Acetylcholin, beeinträchtigte Vasodilatation
ROS-Quantifizierung mittels DHE	keine ROS Erhöhung	ROS-Erhöhung
mRNA-Expressionsniveau von Redoxenzymen	kein Unterschied bei der Expression von NOX1, NOX2, NOX4	NOX1, NOX2 erhöht im Endothel; NOX4 erhöht in glatter Muskelschicht
LOX1-Rezeptor Expressionsniveau	sehr geringe LOX-1 Rezeptor Expression, sowie in Wildtyp-Mäusen	LOX-1 hochreguliert

6. Zusammenfassung

Atherogene Lipoproteine könnten die vaskuläre Reaktivität beeinträchtigen, die zur Gewebeschädigung in verschiedenen Organen, einschließlich des Auges, führt. Das Ziel dieser Arbeit war die Hypothese zu prüfen, dass die Gefäßreaktivität der Arteria ophthalmica in Mäusen denen die Apolipoprotein E Gen fehlt (ApoE^{-/-}), ein Tiermodell für Hypercholesterinämie und Atherosklerose, beeinträchtigt wird. Zwölf Monate alte männliche ApoE^{-/-}-Mäuse und gleichaltrige Wildtyp-Kontrolltiere wurden zur Untersuchung der vaskulären Reaktivität mittels Videomikroskopie verwendet. Zudem wurden vaskuläre Morphologie, das Level von ROS und von RNS, die Genexpression von prooxidativen Redoxenzymen und von LOX-1 Rezeptor in der Arteria ophthalmica und in der Aorta quantifiziert.

Die wichtigsten Ergebnisse waren, dass, im Gegenteil zur Aorta, keine Anzeichen von endothelialer Dysfunktion in der Arteria ophthalmica der ApoE^{-/-}-Mäusen beobachtet werden konnten. Daraufhin trugen eNOS, Cytochrom P450 Monooxygenase, Lipoxigenase und Gap Junctions zu einer Acetylcholin-bedingten Vasodilatation in der Arteria ophthalmica bei ApoE^{-/-}-Mäusen sowie bei Wildtyp-Mäusen. Es wurden keine Hinweise auf Kompensationsmechanismen identifiziert, zur Erhaltung der cholinergischen Vasodilatation in der Arteria ophthalmica der ApoE^{-/-}-Modelle. Überraschend waren die ROS-Level in der Aorta der ApoE^{-/-}-Mäusen erhöht, jedoch nicht in der Arteria ophthalmica. Außerdem war die NOX4 m-RNA Expression in der Aorta der ApoE^{-/-}-Modelle wesentlich erhöht, allerdings wurde keine Differenz bei prooxidativen Redoxgen-Expression in der Arteria ophthalmica von beiden Mäuse Genotypen festgestellt. Bemerkenswerterweise konnte die LOX-1 Genexpression in der Arteria ophthalmica der ApoE^{-/-}-Mäusen nicht nachgewiesen werden, während ihre Genexpression im Endothel sowie in der glatten Muskulatur der Aorta erhöht war.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ApoE^{-/-}-Mäuse eine endotheliale Dysfunktion in der Aorta aufgrund von oxidativem Stress entwickeln, wahrscheinlich durch die Beteiligung von NOX1 und NOX2, während NOX4 möglicherweise in die Bildung des Atheroms involviert ist. Im Gegensatz dazu zeigt sich die Arteria ophthalmica resistent gegen chronische Apolipoprotein E Defizienz. Ein Defizit von LOX-1 Expression ist eine mögliche Erklärung für die fehlende Reaktion auf erhöhte oxLDL-Level.

7. Literaturverzeichnis

1. Mundal LJ, Igland J, Veierod MB, Holven KB, Ose L, Selmer RM, et al. Impact of age on excess risk of coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolaemia. *Heart*. 2018.
2. Mollazadeh H, Carbone F, Montecucco F, Pirro M, Sahebkar A. Oxidative burden in familial hypercholesterolemia. *J Cell Physiol*. 2018;233(8):5716-25.
3. Wong MG, Wanner C, Knight J, Perkovic V. Lowering cholesterol in chronic kidney disease: is it safe and effective? *Eur Heart J*. 2015;36(43):2988-95.
4. Appleton JP, Scutt P, Sprigg N, Bath PM. Hypercholesterolaemia and vascular dementia. *Clin Sci (Lond)*. 2017;131(14):1561-78.
5. Cheung N, Lim L, Wang JJ, Islam FM, Mitchell P, Saw SM, et al. Prevalence and risk factors of retinal arteriolar emboli: the Singapore Malay Eye Study. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(4):620-4.
6. Stojakovic T, Scharnagl H, Marz W, Winkelmann BR, Boehm BO, Schmut O. Low density lipoprotein triglycerides and lipoprotein(a) are risk factors for retinal vascular occlusion. *Clin Chim Acta*. 2007;382(1-2):77-81.
7. Marcucci R, Sodi A, Giambene B, Liotta AA, Poli D, Mannini L, et al. Cardiovascular and thrombophilic risk factors in patients with retinal artery occlusion. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18(4):321-6.
8. Sharifzad M, Witkowska KJ, Aschinger GC, Sapeta S, Rauch A, Schmidl D, et al. Factors Determining Flicker-Induced Retinal Vasodilation in Healthy Subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(7):3306-12.
9. Reimann M, Prieur S, Lippold B, Bornstein SR, Reichmann H, Julius U, et al. Retinal vessel analysis in hypercholesterolemic patients before and after LDL apheresis. *Atheroscler Suppl*. 2009;10(5):39-43.
10. Forstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(4):713-35.
11. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, Cahill PA. Nox, Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(4).
12. Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, van Hinsbergh VWM, Iruela-Arispe ML, et al. Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors-a review. *Cardiovasc Res*. 2018;114(1):35-52.
13. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(1):133-40.
14. Sun R, Tian J, Zhang J, Wang L, Guo J, Liu Y. Monitoring inflammation injuries in the progression of atherosclerosis with contrast enhanced ultrasound molecular imaging. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186155.
15. Dinh QN, Chrissobolis S, Diep H, Chan CT, Ferens D, Drummond GR, et al. Advanced atherosclerosis is associated with inflammation, vascular dysfunction and oxidative stress, but not hypertension. *Pharmacol Res*. 2017;116:70-6.
16. Hayreh SS. Orbital vascular anatomy. *Eye (Lond)*. 2006;20(10):1130-44.
17. Toma N. Anatomy of the Ophthalmic Artery: Embryological Consideration. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2016;56(10):585-91.
18. von Arx T, Tamura K, Yukiya O, Lozanoff S. The Face - A Vascular Perspective. A literature review. *Swiss Dent J*. 2018;128(5):382-92.
19. Hedges TR. Ophthalmic artery blood flow in humans. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(11):1197.
20. Lee D, Tomita Y, Yang L, Negishi K, Kurihara T. Ocular Ischemic Syndrome and Its Related Experimental Models. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9).
21. Ciulla TA, Harris A, Latkany P, Piper HC, Arend O, Garzosi H, et al. Ocular perfusion abnormalities in diabetes. *Acta Ophthalmol Scand*. 2002;80(5):468-77.

22. Kim KE, Oh S, Baek SU, Ahn SJ, Park KH, Jeoung JW. Ocular Perfusion Pressure and the Risk of Open-Angle Glaucoma: Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):10056.
23. Caprioli J, Coleman AL, Blood Flow in Glaucoma D. Blood pressure, perfusion pressure, and glaucoma. *Am J Ophthalmol*. 2010;149(5):704-12.
24. Costa VP, Harris A, Anderson D, Stodtmeister R, Cremasco F, Kergoat H, et al. Ocular perfusion pressure in glaucoma. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(4):e252-66.
25. Senthil S, Dada T, Das T, Kaushik S, Puthuran GV, Philip R, et al. Neovascular glaucoma - A review. *Indian J Ophthalmol*. 2021;69(3):525-34.
26. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
27. Ruan Y, Jiang S, Musayeva A, Gericke A. Oxidative Stress and Vascular Dysfunction in the Retina: Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8).
28. Hsueh YJ, Chen YN, Tsao YT, Cheng CM, Wu WC, Chen HC. The Pathomechanism, Antioxidant Biomarkers, and Treatment of Oxidative Stress-Related Eye Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3).
29. Wang S, Ji LY, Li L, Li JM. Oxidative stress, autophagy and pyroptosis in the neovascularization of oxygen-induced retinopathy in mice. *Mol Med Rep*. 2019;19(2):927-34.
30. Zanza C, Thangathurai J, Audo A, Muir HA, Candelli M, Pignataro G, et al. Oxidative stress in critical care and vitamins supplement therapy: "a beneficial care enhancing". *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(17):7703-12.
31. Zinflou C, Rochette PJ. Ultraviolet A-induced oxidation in cornea: Characterization of the early oxidation-related events. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:118-28.
32. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009;7(1):65-74.
33. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. 2020;20(1):16-26.
34. Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, et al. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9702820.
35. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):501-14.
36. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
37. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(3-4):222-30.
38. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552(Pt 2):335-44.
39. Carrera-Julia S, Moreno ML, Barrios C, de la Rubia Orti JE, Drehmer E. Antioxidant Alternatives in the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Comprehensive Review. *Front Physiol*. 2020;11:63.
40. Kaludercic N, Di Lisa F. Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:12.
41. Taurone S, Ralli M, Artico M, Madia VN, Scarpa S, Nottola SA, et al. Oxidative stress and visual system: a review. *EXCLI J*. 2022;21:544-53.
42. Reddy VB, Ayse & Perry, George & Cooke, Marcus & Sayre, Lawrence & Smith, Mark. The Role of Oxidative Damage to Nucleic Acids in the Pathogenesis of Neurological Disease. 2009.
43. Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(6):711-7.
44. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
45. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*. 1993;18(4):195-9.
46. Cudd A, Fridovich I. Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1982;257(19):11443-7.

47. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(7):1716-23.
48. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87(1):245-313.
49. Schmidt HM, Kelley EE, Straub AC. The impact of xanthine oxidase (XO) on hemolytic diseases. *Redox Biol.* 2019;21:101072.
50. Sanz-Morello B, Ahmadi H, Vohra R, Saruhanian S, Freude KK, Hamann S, et al. Oxidative Stress in Optic Neuropathies. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(10).
51. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J.* 2008;275(15):3959-70.
52. Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Lopez-Huertas E, Romero-Puertas MC, Barroso JB, et al. Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radic Res.* 1999;31 Suppl:S235-41.
53. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):558-67.
54. 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.
55. Birk M, Baum E, Zadeh JK, Manicam C, Pfeiffer N, Patzak A, et al. Angiotensin II Induces Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Mouse Ophthalmic Arteries via Involvement of AT1 Receptors and NOX2. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(8).
56. 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).
57. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006;58(1):87-114.
58. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 2002;33(6):774-97.
59. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049-55.
60. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology.* 2001;40(8):959-75.
61. Ji LL, Yeo D. Oxidative stress: an evolving definition. *Fac Rev.* 2021;10:13.
62. Engwa GA. Free Radicals and the Role of Plant Phytochemicals as Antioxidants Against Oxidative Stress-Related Diseases. *Phytochemicals - Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention.* 2018.
63. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *Biomed Res Int.* 2014;2014:406960.
64. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(6):453-71.
65. Barreto J, Karathanasis SK, Remaley A, Sposito AC. Role of LOX-1 (Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1) as a Cardiovascular Risk Predictor: Mechanistic Insight and Potential Clinical Use. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):153-66.
66. Kattoor AJ, Kanuri, S.H., Mehta, J.L. Role of Ox-LDL and LOX-1 in Atherogenesis. *Curr Med Chem.* 2018.
67. Zhang Q, Liu J, Liu J, Huang W, Tian L, Quan J, et al. oxLDL induces injury and defenestration of human liver sinusoidal endothelial cells via LOX1. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(2):281-93.
68. Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(8):1263-73.
69. Gorren AC, Kungl AJ, Schmidt K, Werner ER, Mayer B. Electrochemistry of pterin cofactors and inhibitors of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide.* 2001;5(2):176-86.

70. Bec N, Gorren AFC, Mayer B, Schmidt PP, Andersson KK, Lange R. The role of tetrahydrobiopterin in the activation of oxygen by nitric-oxide synthase. *J Inorg Biochem.* 2000;81(3):207-11.
71. Werner ER, Gorren AC, Heller R, Werner-Felmayer G, Mayer B. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(11):1291-302.
72. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9220-5.
73. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2017;38(32):2459-72.
74. Boren J, Chapman MJ, Krauss RM, Packard CJ, Bentzon JF, Binder CJ, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: a consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J.* 2020;41(24):2313-30.
75. Stone NJ, Grundy SM. The 2018 AHA/ACC/Multi-Society Cholesterol guidelines: Looking at past, present and future. *Prog Cardiovasc Dis.* 2019;62(5):375-83.
76. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3).
77. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation.* 2013;127(8):891-904.
78. Annema W, Willemsen HM, de Boer JF, Dijkers A, van der Giet M, Nieuwland W, et al. HDL function is impaired in acute myocardial infarction independent of plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Lipidol.* 2016;10(6):1318-28.
79. Oberbach A, Adams V, Schlichting N, Heinrich M, Kullnick Y, Lehmann S, et al. Proteome profiles of HDL particles of patients with chronic heart failure are associated with immune response and also include bacteria proteins. *Clin Chim Acta.* 2016;453:114-22.
80. Ortiz-Munoz G, Couret D, Lapergue B, Bruckert E, Meseguer E, Amarenco P, et al. Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis.* 2016;253:75-80.
81. Chuang ST, Cruz S, Narayanaswami V. Reconfiguring Nature's Cholesterol Accepting Lipoproteins as Nanoparticle Platforms for Transport and Delivery of Therapeutic and Imaging Agents. *Nanomaterials (Basel).* 2020;10(5).
82. Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des.* 2008;14(4):338-51.
83. Civeira F, Arca M, Cenarro A, Hegele RA. A mechanism-based operational definition and classification of hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol.* 2022;16(6):813-21.
84. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
85. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol.* 2010;610:403-17.
86. Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1086-95.
87. Luchetti F, Crinelli R, Nasoni MG, Benedetti S, Palma F, Fraternali A, et al. LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims? *Br J Pharmacol.* 2021;178(16):3104-14.
88. Kojima C, Ino J, Ishii H, Nitta K, Yoshida M. MMP-9 inhibition by ACE inhibitor reduces oxidized LDL-mediated foam-cell formation. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17(1):97-105.
89. Couto NF, Rezende L, Fernandes-Braga W, Alves AP, Agero U, Alvarez-Leite J, et al. OxLDL alterations in endothelial cell membrane dynamics leads to changes in vesicle trafficking and increases cell susceptibility to injury. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020;1862(3):183139.

90. Liao L, Granger DN. Modulation of oxidized low-density lipoprotein-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Am J Physiol.* 1995;268(4 Pt 2):H1643-50.
91. Ohki I, Ishigaki T, Oyama T, Matsunaga S, Xie Q, Ohnishi-Kameyama M, et al. Crystal structure of human lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor 1 ligand binding domain and its ligand recognition mode to OxLDL. *Structure.* 2005;13(6):905-17.
92. Tate S. Oxidized low-density lipoprotein receptor, LOX-1, on the endothelial cell – The receptor structure and functions of LOX-1 in atherogenesis. *J Biol Macromol.* 2007;7(2):11-22.
93. Thakkar S, Wang X, Khaidakov M, Dai Y, Gokulan K, Mehta JL, et al. Structure-based Design Targeted at LOX-1, a Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Sci Rep.* 2015;5:16740.
94. Xie Q, Matsunaga S, Niimi S, Ogawa S, Tokuyasu K, Sakakibara Y, et al. Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells. *DNA Cell Biol.* 2004;23(2):111-7.
95. Ganjali S, Keshavarz R, Hosseini S, Mansouri A, Mannarino MR, Pirro M, et al. Evaluation of Oxidative Stress Status in Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Med.* 2021;10(24).
96. Manicam C, Staubitz J, Brochhausen C, Grus FH, Pfeiffer N, Gericke A. The Gatekeepers in the Mouse Ophthalmic Artery: Endothelium-Dependent Mechanisms of Cholinergic Vasodilation. *Sci Rep.* 2016;6:20322.
97. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation.* 2001;103(9):1282-8.
98. Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, Koto T, Satofuka S, Ozawa Y, et al. Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(9):4342-50.
99. Mukandala G, Tynan R, Lanigan S, O'Connor JJ. The Effects of Hypoxia and Inflammation on Synaptic Signaling in the CNS. *Brain Sci.* 2016;6(1).
100. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem.* 1994;269(13):9889-97.
101. Lee SR, An EJ, Kim J, Bae YS. Function of NADPH Oxidases in Diabetic Nephropathy and Development of Nox Inhibitors. *Biomol Ther (Seoul).* 2020;28(1):25-33.
102. Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, Hosseinzadeh A, Reiter RJ, Safa M, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 2018;193:20-33.
103. Pang B, Li M, Song J, Li QW, Wang J, Di S, et al. Luo Tong formula attenuates retinal inflammation in diabetic rats via inhibition of the p38MAPK/NF-kappaB pathway. *Chin Med.* 2020;15:5.
104. Lazzara F, Fidilio A, Platania CBM, Giurdanella G, Salomone S, Leggio GM, et al. Aflibercept regulates retinal inflammation elicited by high glucose via the PIGF/ERK pathway. *Biochem Pharmacol.* 2019;168:341-51.
105. Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* 2013;2013:343560.
106. Gericke A, Kordasz ML, Steege A, Sanbe A, Goloborodko E, Vetter JM, et al. Functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in murine ophthalmic arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4795-9.
107. Gericke A, Mayer VG, Steege A, Patzak A, Neumann U, Grus FH, et al. Cholinergic responses of ophthalmic arteries in M3 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(10):4822-7.
108. Faraci FM, Baumbach GL, Heistad DD. Cerebral circulation: humoral regulation and effects of chronic hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 1990;1(1):53-7.
109. Heistad DD, Baumbach GL, Faraci FM, Armstrong ML. Sick vessel syndrome: vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *J Hum Hypertens.* 1995;9(6):449-53.
110. Baumbach GL, Sigmund CD, Faraci FM. Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension.* 2003;41(1):50-5.

111. Baumbach GL, Dobrin PB, Hart MN, Heistad DD. Mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Circ Res.* 1988;62(1):56-64.
112. Baumbach GL, Hajdu MA. Mechanics and composition of cerebral arterioles in renal and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1993;21(6 Pt 1):816-26.
113. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, Habermeier A, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(12):2536-44.
114. Schröder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, et al. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(9):1353-60.
115. Beleznai T, Takano H, Hamill C, Yarova P, Douglas G, Channon K, et al. Enhanced K(+)-channel-mediated endothelium-dependent local and conducted dilation of small mesenteric arteries from ApoE(-/-) mice. *Cardiovasc Res.* 2011;92(2):199-208.
116. Manicam C, Ginter N, Li H, Xia N, Goloborodko E, Zadeh JK, et al. Compensatory Vasodilator Mechanisms in the Ophthalmic Artery of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Knockout Mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):7111.
117. Alp NJ, McAteer MA, Khoo J, Choudhury RP, Channon KM. Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):445-50.
118. Mehta JL, Sanada N, Hu CP, Chen J, Dandapat A, Sugawara F, et al. Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet. *Circ Res.* 2007;100(11):1634-42.
119. Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(2):266-74.
120. Arcaro G, Zenere BM, Travia D, Zenti MG, Covi G, Lechi A, et al. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis.* 1995;114(2):247-54.
121. Casino PR, Kilcoyne CM, Cannon RO, 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Impaired endothelium-dependent vascular relaxation in patients with hypercholesterolemia extends beyond the muscarinic receptor. *Am J Cardiol.* 1995;75(1):40-4.
122. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation.* 1993;88(6):2541-7.
123. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Kai H, et al. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1993;91(1):29-37.
124. Kato M, Shiode N, Teragawa H, Hirao H, Yamada T, Yamagata T, et al. The role of nitric oxide in bradykinin-induced dilation of coronary resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. *Intern Med.* 1999;38(5):394-400.
125. Chen X, Zhang H, Hill MA, Zhang C, Park Y. Regulation of Coronary Endothelial Function by Interactions between TNF-alpha, LOX-1 and Adiponectin in Apolipoprotein E Knockout Mice. *J Vasc Res.* 2015;52(6):372-82.
126. Kitayama J, Faraci FM, Lentz SR, Heistad DD. Cerebral vascular dysfunction during hypercholesterolemia. *Stroke.* 2007;38(7):2136-41.
127. Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(2):H428-34.
128. Krummen S, Falck JR, Thorin E. Two distinct pathways account for EDHF-dependent dilatation in the gracilis artery of dyslipidaemic hApoB+/+ mice. *Br J Pharmacol.* 2005;145(2):264-70.
129. Wolfle SE, de Wit C. Intact endothelium-dependent dilation and conducted responses in resistance vessels of hypercholesterolemic mice in vivo. *J Vasc Res.* 2005;42(6):475-82.

130. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2793-9.
131. 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.
132. Gericke A, Steege A, Manicam C, Bohmer T, Wess J, Pfeiffer N. Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor subtype in murine ophthalmic arteries after endothelial removal. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(1):625-31.
133. d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CB, Smith L, Weiler D, Sieck GC, et al. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(6):1017-22.
134. Senn B, Orgul S, Keller U, Dickermann D, Dubler B, Vavrecka J, et al. Retrobulbar and peripheral capillary blood flow in hypercholesterolemic subjects. *Am J Ophthalmol.* 1999;128(3):310-6.
135. 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.
136. Judkins CP, Diep H, Broughton BR, Mast AE, Hooker EU, Miller AA, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(1):H24-32.
137. Nomura J, Busso N, Ives A, Matsui C, Tsujimoto S, Shirakura T, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci Rep.* 2014;4:4554.
138. Sheehan AL, Carrell S, Johnson B, Stanic B, Banfi B, Miller FJ, Jr. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2011;216(2):321-6.
139. Quesada IM, Lucero A, Amaya C, Meijles DN, Cifuentes ME, Pagano PJ, et al. Selective inactivation of NADPH oxidase 2 causes regression of vascularization and the size and stability of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2015;242(2):469-75.
140. Craigie SM, Kant S, Reif M, Chen K, Pei Y, Angoff R, et al. Endothelial NADPH oxidase 4 protects ApoE^{-/-} mice from atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:1-7.
141. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, El-Osta A, et al. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(2):295-307.
142. Hu P, Wu X, Khandelwal AR, Yu W, Xu Z, Chen L, et al. Endothelial Nox4-based NADPH oxidase regulates atherosclerosis via soluble epoxide hydrolase. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1382-91.
143. Schroder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res.* 2012;110(9):1217-25.
144. Vendrov AE, Vendrov KC, Smith A, Yuan J, Sumida A, Robidoux J, et al. NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(18):1389-409.
145. Xu S, Chamseddine AH, Carrell S, Miller FJ, Jr. Nox4 NADPH oxidase contributes to smooth muscle cell phenotypes associated with unstable atherosclerotic plaques. *Redox Biol.* 2014;2:642-50.
146. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24(24):10703-17.
147. Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *Journal of The Royal Society Interface.* 2013;10(83):20121004.
148. Concannon J, Dockery P, Black A, Sultan PS, Hynes N, McHugh P, et al. Quantification of the regional bioarchitecture in the human aorta. *Journal of Anatomy.* 2019;236.

149. Delaey C, Van De Voorde J. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res.* 2000;32(6):249-56.
150. 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.
151. Nemeth J, Knezy K, Tapasztó B, Kovacs R, Harkanyi Z. Different autoregulation response to dynamic exercise in ophthalmic and central retinal arteries: a color Doppler study in healthy subjects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2002;240(10):835-40.
152. Pournaras CJ, Rungger-Brandle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(3):284-330.