

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

Einfluss von „Liraglutid“ auf die Endothelfunktion der Arteria ophthalmica im Sepsismodell
der Maus

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

Vorgelegt von

Wael Omran
aus Tartous

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 05.12.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| 1. Hintergrund der Arbeit | 5 |
| 2. Literaturdiskussion..... | 7 |
| 2.1 Anatomie und Physiologie des menschlichen Auges | 7 |
| 2.2 Blutversorgung des Augapfels..... | 10 |
| 2.3 Vaskuläre Endothelfunktion | 11 |
| 2.4 Endotheliale Dysfunktion | 14 |
| 2.4.1 Definition..... | 14 |
| 2.4.2 Endotheliale Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis | 14 |
| 2.4.3. Endotheliale Dysfunktion bei okulären Erkrankungen..... | 15 |
| 2.5 Liraglutid | 17 |
| 2.5.1 Substanzeigenschaften | 17 |
| 2.5.2 Vaskuläre Wirkungen von Liraglutid | 18 |
| 3. Material und Methoden | 20 |
| 3.1 Material..... | 20 |
| 3.1.1 Phenylephrin..... | 20 |
| 3.1.2 Natriumnitroprussid | 21 |
| 3.1.3 Acetylcholin..... | 21 |
| 3.2 Sepsismodell der Maus | 22 |
| 3.3 Funktionelle Untersuchung an Gefäßen der murinen Arteria Ophthalmica | 22 |
| 3.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen am Gewebeschnitt | 24 |
| DHE-Färbung | 24 |
| 3.5 Statistik | 26 |
| 4. Ergebnisse..... | 27 |
| 4.1 Funktionelle Untersuchungen der murinen Arteria ophthalmica..... | 27 |
| 4.1.1 Phenylephrin..... | 27 |
| 4.1.2 Natrium Nitroprussid | 28 |
| 4.1.3 Acetylcholin..... | 29 |
| 4.2 Detektion von oxidativem Stress an der Arteria ophthalmica mittels DHE-Färbung | 30 |
| 5. Diskussion | 32 |
| 5.1 Reaktion der Endothelzellen auf Stressfaktoren | 34 |
| 5.1.1 Reaktionen der vaskulären Endothelzellen auf den oxidativen Stress | 36 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2 Oxidativer Stress und der Nuklearfaktor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Signalweg | 38 |
| 5.2 Vaskuläre Veränderungen während der Sepsis | 40 |
| 5.3 Einfluss von Liraglutid auf das vaskuläre Endothel | 42 |
| 5.4 Einflussfaktoren auf den oxidativen Stress in der Immunhistochemischen Färbung..... | 44 |
| 5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse | 46 |
| 6. Zusammenfassung | 47 |
| 7. Abbildungsverzeichnis..... | 48 |
| 8. Danksagung | 50 |
| 9. Lebenslauf | 51 |
| Literatur | 53 |

1. Hintergrund der Arbeit

Das vaskuläre Endothel spielt eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese, der Hämostase, bei Entzündungsreaktionen und bei der Regulation des Gefäßdurchmessers. Diese Wirkmechanismen stehen im Zusammenhang mit der Freisetzung verschiedener potenter vasoaktiver Substanzen aus dem Gefäßendothel wie z.B. Vasokonstriktoren, wie Endothelin-1 (ET-1), Angiotensin II und Thromboxan bzw. Vasodilatoren, wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin und Wasserstoffperoxid. Indem das Gefäßendothel eine bedarfsgerechte Freisetzung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren gewährleistet, spielt es eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Gefäßtonus [1].

Als wichtiger Regulator der lokalen vaskulären Homöostase trägt das Endothel bedeutend zum Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Hemmung und Förderung der Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, Prävention und Stimulation der Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen sowie von Thrombogenese und Fibrinolyse bei [2]. Die Störung dieses streng regulierten Gleichgewichts führt zu einer endothelialen Dysfunktion.

Der Begriff "endotheliale Dysfunktion" wurde Mitte der 1980er Jahre definiert, nachdem Furchgott und Zawadzki entdeckten, dass Acetylcholin die Anwesenheit der Endothelzellen erfordert, um den darunter liegenden glatten Gefäßmuskel zu entspannen [3].

Vor der Identifizierung des Stickstoffmonoxids als einen durch Acetylcholin aus dem Gefäßendothel freigesetzten Faktor, wurde bereits beobachtet, dass die endothelabhängigen Relaxationen in der Aorta von hypertensiven Ratten [4,5] und hypercholesterolemischen Kaninchen [6,7] beeinträchtigt waren. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei menschlichen Koronararterien von atherosklerotischen Patienten gemacht [8] und es wurde vermutet, dass diese endotheliale Dysfunktion ein früher Indikator für Atherosklerose sein könnte [9].

Seitdem wird der Begriff "endotheliale Dysfunktion" nicht nur mit Bluthochdruck oder Atherosklerose in Zusammenhang gebracht, sondern auch mit physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, einschließlich Alterung, Herz- und Niereninsuffizienz, Koronarsyndrom, Infektionen, Sepsis und Diabetes Mellitus Typ I und Typ II [1].

Auch für das primäre Offenwinkelglaukom werden mehrere mögliche Mechanismen als Ursachen diskutiert, zu denen auch eine fehlerhafte Durchblutungsregulation zählt [10]. So wird neben einer mechanischen Funktionsstörung von Axonen durch die Kompression der

Lamina cribrosa auch eine vaskuläre Dysfunktion, die eine Ischämie im Sehnerv verursacht, vermutet. Die vaskuläre Hypothese für die Entwicklung eines Glaukoms impliziert, dass eine glaukomatöse Ganglienzellschädigung zumindest teilweise durch eine chronische Beeinträchtigung der Blutversorgung im Sehnervenkopf verursacht wird [11,12]. Die reduzierte Durchblutung des Sehnervenkopfes beim Offenwinkelglaukom wurde in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt [13,14].

Das Glukagon-ähnliche Peptid-1 (engl. Glukagon-Like-Peptid-1, GLP-1) spielt eine gut dokumentierte Rolle in der glukosestimulierten Insulinfreisetzung und der Erhaltung der Plasmaglukosehomöostase [15]. In vivo-Studien zeigten, dass das native GLP-1 den vaskulären Tonus und die Endothelfunktion regulieren kann [16] [17]. Liraglutid, ein acyliertes GLP-1-Analogon [18], übt eine ausgeprägte antioxidative und antiinflammatorische Wirkung auf Endothelzellen aus, indem es die Protein-Kinase C- α (PKC- α), die prooxidative NADPH-Oxidase und den NF κ B- Signalweg hemmt und antientzündliche Enzyme aktiviert [19]. Außerdem kann Liraglutid die Blut-Hirn-Schranke überqueren und im zentralen Nervensystem antientzündliche Effekte vermitteln [20] [21].

In einer Studie wurde ein positiver Einfluss von Liraglutid auf die vaskuläre Endothelfunktion der Aorta gezeigt, indem es durch die Aktivierung des GLP-1-Rezeptors die endotheliale Dysfunktion in ApoE-defizienten Mäusen hemmen konnte [22]. An okulären Blutgefäßen wurde die Rolle von Liraglutid jedoch noch nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Hypothese zu testen, dass Liraglutid eine endotheliale Dysfunktion in der Arteria ophthalmica verbessern kann. Die Induktion der endothelialen Dysfunktion erfolgte an einem Sepsismodel der Maus.

2. Literaturdiskussion

2.1 Anatomie und Physiologie des menschlichen Auges

Das Auge ist eine leicht asymmetrische Kugel mit einem sagittalen Durchmesser von 24 bis 25 mm und einem Querdurchmesser von 24 mm. Es hat ein Volumen von ca. 6,5 ccm [23]

Eine Querschnittsansicht des Auges zeigt drei verschiedene Schichten: (Abb. 2.1.1)

- Die äußere Schicht wird durch die Sklera und die Hornhaut gebildet.
- Die Zwischenschicht wird in zwei Teile unterteilt: anterior (Iris und Ziliarkörper) und posterior (Aderhaut).
- Die innere Schicht ist die Netzhaut, die den sensorischen Teil des Auges darstellt. [23]

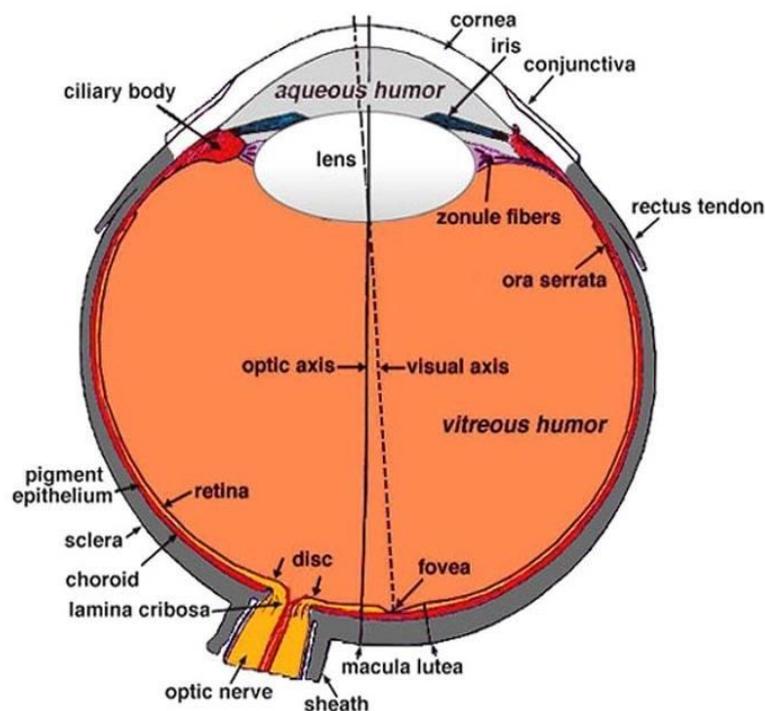


Abb. 2.1.1: Querschnittsansicht des menschlichen Auges

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/figure/A11/?report=objectonly>

Drei Flüssigkeitskammern: Vorderkammer (zwischen Hornhaut und Iris), Hinterkammer (zwischen Iris, Zonenfasern und Linse) und Glaskörperraum (zwischen Linse und Netzhaut). Die ersten beiden Kammern sind mit Kammerwasser gefüllt, während der Glaskörperraum mit einer gelartigen Flüssigkeit, dem Glaskörper, gefüllt ist [23].

Der sagittale Anschnitt des Auges zeigt auch die Linse, eine transparente Struktur hinter der Iris. Die Linse ist durch Bänder (sogenannte Zonulafasern) befestigt, die am vorderen Teil des Ziliarkörpers ansetzen. Die Kontraktion oder Entspannung dieser Bänder als Folge von Ziliarmuskelaktionen verändert die Form der Linse, ein Prozess, der als Akkommodation bezeichnet wird und es ermöglicht, ein scharfes Bild auf der Netzhaut zu erzeugen [23].

In Konsistenz mit ihrem Status als vollwertiger Teil des zentralen Nervensystems umfasst die Netzhaut komplexe neuronale Schaltwege, die die abgestufte elektrische Aktivität von Photorezeptoren in Aktionspotenziale umwandeln, die über Axone im Sehnerv ins Gehirn gelangen [24].

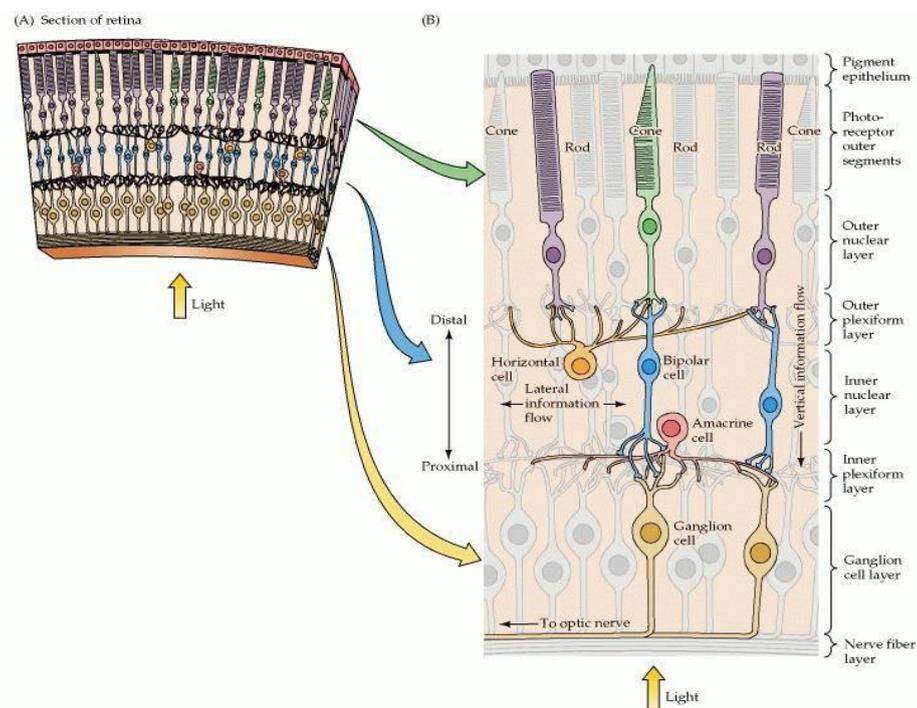


Abb. 2.1.2: Struktur der Netzhaut. (A) Schnitt durch die Netzhaut, der die Gesamtanordnung der Netzhautschichten zeigt. (B) Diagramm der Grundstruktur der Netzhaut. Ein Drei-Neuronen-Ketten-Photorezeptor, eine bipolare Zelle und eine Ganglienzelle bieten den direktesten Weg zur Übertragung visueller Informationen an das Gehirn. Horizontale Zellen und Amakrine Zellen vermitteln laterale Wechselwirkungen in der äußeren und inneren plexiformen Schicht. Die Begriffe innen und außen bezeichnen relative Abstände von der Mitte des Auges (innen, nahe der Mitte des Auges; außen, weg von der Mitte oder in Richtung des Pigmentepithels) [24]. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10885/figure/A740/?report=objectonly>)

Obwohl sie die gleichen Arten von Funktionselementen und Neurotransmittern wie andere Teile des zentralen Nervensystems aufweist, umfasst die Netzhaut nur wenige Klassen von Neuronen, die in einer Weise angeordnet sind, die weniger schwer aufzulösen ist als die Schaltkreise in anderen Bereichen des Gehirns [24]. Es gibt fünf Arten von Neuronen in der Netzhaut: Photorezeptoren, bipolare Zellen, Ganglienzellen, horizontale Zellen und

Amakrinzellen [24]. Die Zellkörper und Zellfortsätze dieser Neuronen sind in fünf abwechselnden Schichten angeordnet, wobei sich die Zellkörper in den inneren und äußeren Körnerschichten und der Ganglienzellschicht befinden und die Zellfortsätze und synaptischen Kontakte in den inneren und äußeren plexiformen Schichten (siehe Abbildung 2.1.2) [23,24]. Eine direkte Drei-Neuronen-Kette-Photorezeptorzelle zur Bipolarzelle zur Ganglienzelle - ist der Hauptweg des Informationsflusses von den Photorezeptoren zum Sehnerv [24].

Es gibt zwei Arten von lichtempfindlichen Elementen in der Netzhaut: Stäbchen und Zapfen. Beide Arten von Photorezeptoren haben ein äußeres Segment, das aus photopigmentreichen Membranscheiben besteht und an die Pigmentepithelschicht anliegt sowie ein inneres Segment, das den Zellkern enthält und zu synaptischen Terminalen führt, die bipolare oder horizontale Zellen kontaktieren [24]. Die Absorption von Licht durch das Photopigment im äußeren Segment der Photorezeptoren löst eine Kaskade von Ereignissen aus, die das Membranpotential des Rezeptors verändert und somit die Menge des von den Photorezeptorsynapsen freigesetzten Neurotransmitters auf die Zellen, die sie kontaktieren [24][23]. Die Synapsen zwischen Photorezeptoren und bipolaren Zellen (und horizontalen Zellen) sind in der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert. Genauer gesagt, die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht, während die Zellkörper der bipolaren Zellen in der inneren Körnerschicht liegen[24]. Die kurzen axonalen Prozesse der bipolaren Zellen bilden wiederum synaptische Kontakte zu den dendritischen Prozessen der Ganglienzellen in der inneren plexiformen Schicht [24]. Die viel größeren Axone der Ganglienzellen bilden den Sehnerv und transportieren Informationen über die retinale Stimulation an den Rest des zentralen Nervensystems [24].

Die beiden anderen Arten von Neuronen in der Netzhaut, horizontale Zellen und Amakrinzellen, haben ihre Zellkörper in der inneren Körnerschicht und sind in erster Linie für die seitlichen Wechselwirkungen innerhalb der Netzhaut verantwortlich [24]. Diese lateralen Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren, horizontalen Zellen und bipolaren Zellen in der äußeren Plexiformschicht sind weitgehend verantwortlich für die Empfindlichkeit des visuellen Systems gegenüber dem Leuchtdichtekontrast über einen weiten Bereich von Lichtintensitäten [24]. Die Fortsätze der Amakrinzellen, die sich seitlich in der inneren plexiformen Schicht erstrecken, sind postsynaptisch zu bipolaren Zellterminalen und präsynaptisch zu den Dendriten der Ganglienzellen [24]. Die Fortsätze der horizontalen Zellen verzweigen sich in der äußeren plexiformen Schicht. Die Vielfalt der Amakrin-Zell-Subtypen illustriert die allgemeine Regel, dass es zwar nur fünf grundlegende Netzhaut-Zelltypen gibt, es aber innerhalb eines

bestimmten Zelltyps eine beträchtliche Vielfalt geben kann. Diese Vielfalt ist die Grundlage für Wege, die verschiedene Arten von Informationen parallel zu zentralen Zielorten vermitteln [24].

2.2 Blutversorgung des Augapfels

Die Blutversorgung des Augapfels erfolgt über mehrere Äste der Arteria ophthalmica, die ihrerseits aus der Arteria carotis interna entspringt (Abb. 2.2.1) [25]. Zu diesen Zweigen gehören die retinale Zentralarterie, die kurzen und langen posterioren Ziliararterien und die anterioren Ziliararterien [25]. Der venöse Abfluss aus dem Auge erfolgt in erster Linie über die Wirbeladern und die retinale Zentralvene, die mit den inferioren und superioren Vena ophthalmicae fusioniert, die in den Nebenhöhlenbereich, den pterygoiden Venengeflecht und die Gesichtsvene münden [25].

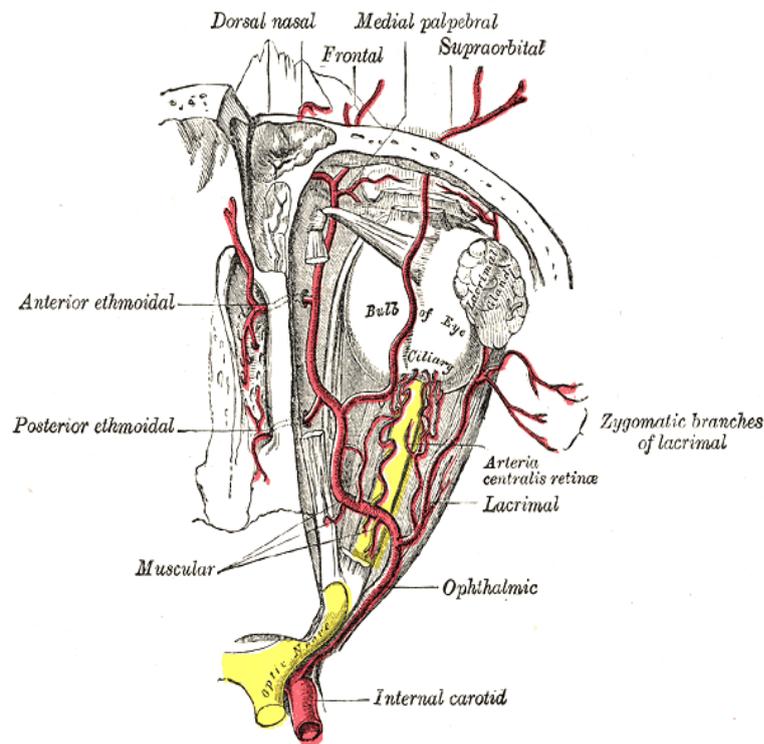


Abb. 2.2.1: Verlauf der Arteria ophthalmica

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray514.png#/media/File:Gray514.png>

Die Iris und der Ziliarkörper werden von den anterioren Ziliararterien, den langen posterioren Ziliararterien und den anastomalen Verbindungen aus der anterioren Aderhaut versorgt [25]. Die vorderen Ziliararterien ziehen entlang der extraokularen Muskeln und durchbohren die Sklera in der Nähe des Limbus, um sich dem großen Arterienkreis der Iris anzuschließen. Die langen posterioren Ziliararterien durchstechen die Lederhaut in der Nähe des posterioren Pols,

wandern dann anterior zwischen Lederhaut und Aderhaut, um sich auch dem großen Arterienkreis der Iris anzuschließen [25]. Der Hauptarterienkreis der Iris gibt Zweige an die Iris und den Ziliarkörper ab [25]. Der größte Teil der venösen Drainage aus dem vorderen Segment wird nach posterior in die Aderhaut und von dort in die Wirbelvenen geleitet [25].

Die Netzhaut wird von der Arteria centralis retinae und den kurzen posterioren Ziliararterien versorgt (Abb. 2.2.2) [25]. Die Arteria centralis retinae verläuft in ihrem letzten Abschnitt im Sehnerv und verzweigt sich, nachdem sie die Sklera durchdrungen hat, in weitere retinale

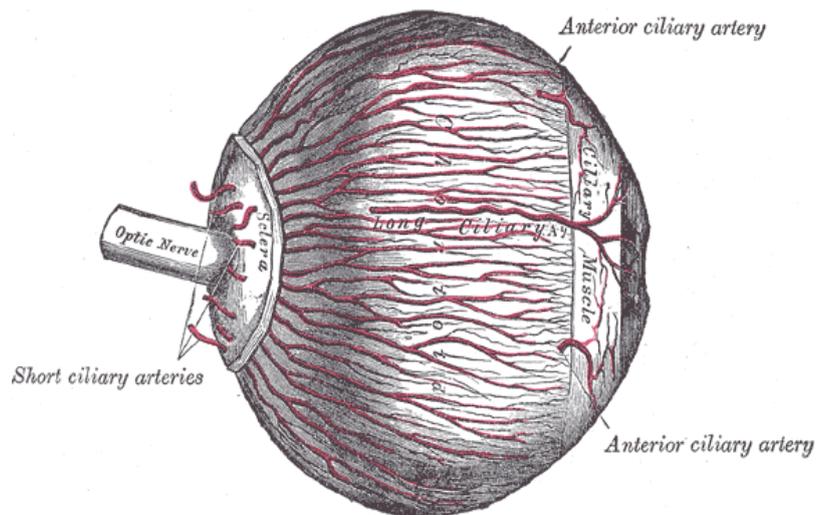


Abb. 2.2.2: Verlauf der Ziliararterien

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray873.png#/media/File:Gray873.png>

Arterien, die die inneren Schichten der Netzhaut versorgen. dann zu den Schichten der inneren Netzhaut. Die retinalen Venulen und Venen vereinigen sich in der Vena centralis retinae, die mit dem Sehnerv parallel und gegenläufig zur Arteria centralis retinae aus dem Augapfel austritt [25].

2.3 Vaskuläre Endothelfunktion

Es ist bekannt, dass das Gefäßendothel, ein aktives parakrines, endokrines und autokrines Organ, für die Regulierung des vaskulären Tonus und Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase unerlässlich ist [26]. Es hält das Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, hemmt und fördert die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, die Prävention und Stimulation der Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen sowie die Thrombogenese und Fibrinolyse [2]. Die Störung dieses streng regulierten Gleichgewichts kann zu einer endothelialen Dysfunktion führen [2].

Die Endothelzellschicht wird nicht mehr als einfache Barriere angesehen. Die letzten zwei Jahrzehnte der Forschung haben eindeutig gezeigt, dass die Endothelzellschicht eine entscheidende Rolle in der gesamten Homöostase des Gefäßsystems spielt, deren Funktionen durch ein kompliziertes System chemischer Mediatoren integriert sind [27–29]. Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Mediator der Endothelzellen. Während des letzten Jahrzehnts hat eine Vielzahl experimenteller Argumente zu dem Konzept geführt, dass Stickstoffmonoxid (engl. Nitric oxide = NO) nicht nur an der Kontrolle des vasomotorischen Tonus, sondern auch an der vaskulären Homöostase sowie an den neuronalen und immunologischen Funktionen beteiligt ist [30]. Endogenes NO wird durch die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin durch das Enzym NO-Synthase (NOS) erzeugt, aus dem mehrere Isoformen isoliert, aufgearbeitet und geklont wurden [30]. NOS-Typ I (aus dem Gehirn isoliert) und Typ III (aus Endothelzellen isoliert) werden als "konstitutive NOS" bezeichnet und produzieren pikomolare NO-Spiegel, von denen nur ein kleiner Teil physiologische Reaktionen hervorruft [30]. Diese Isoformen werden durch Ca(2+)-Calmodulin mit NADPH, Flavin-Adenin-Dinucleotid/Mononucleotid (FAD/FMN) und Tetrahydrobiopterin (HB4) als Kofaktoren reguliert und weisen einen hohen Grad an Homologie mit der Aminosäuresequenz der Cytochrom-P450-Reduktase innerhalb der C-terminalen Domäne auf [30]. Funktionell ist die neuronale NOS Typ I wichtig für die Neurotransmission, die zentrale Steuerung der vaskulären Homöostase und möglicherweise für das Lernen und das Gedächtnis [30]. Im peripheren Nervensystem scheint die NOS mit nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC) neuronalen Bahnen verbunden zu sein [30]. NOS Typ III trägt auch zur Prävention anormaler Thrombozytenaggregation bei [32–38].

Typischerweise wird die NO-abhängige Vasodilatation durch die vasodilatatorische Reaktion auf die Infusion einer Substanz (z.B. Acetylcholin oder Methacholin) untersucht, die die Synthese und Freisetzung von NO über eine rezeptorvermittelte Reaktion erhöht, die calciumabhängig ist [31,39–42], oder als Reaktion auf eine reaktive Hyperämie, die die scherstress-induzierte NO-Produktion stimuliert. Diese Reaktion wird mit der Vasodilatation verglichen, die durch spezifische chemische Verbindungen hervorgerufen wird, die direkt auf der glatten Gefäßmuskel wirken (z.B. Natriumnitroprussid). Der beschriebene Unterschied der Vasodilatation zwischen den beiden Bedingungen kann als endothelabhängige Vasodilatation betrachtet werden [35,43–46].

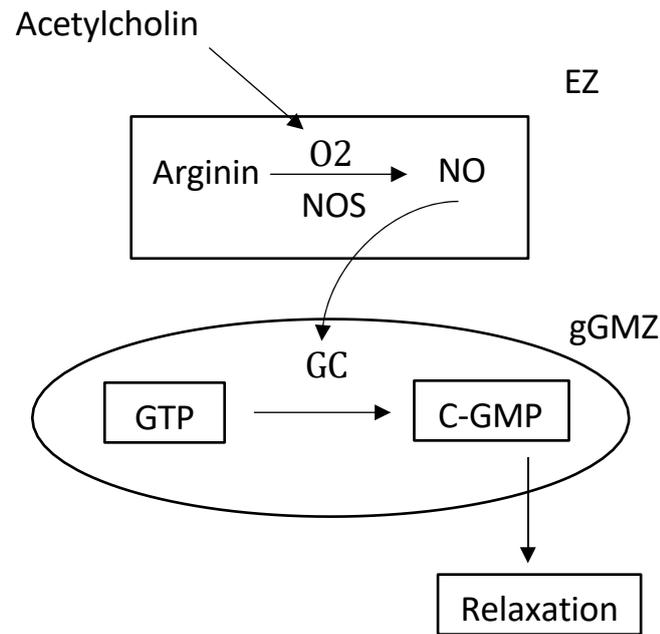


Abb. 2.3.1: Endothelzellen (EZ) als Regulator der glatten Gefäßmuskelzellen. Die EZ produziert Stickstoffmonoxid (NO), ein Gas, das in die glatten Gefäßmuskelzellen (gGMZ) diffundiert und das Enzym Guanylatcyclase (GC) aktiviert, das zyklisches GMP produziert. Letzteres induziert eine Muskelentspannung, die physiologisch in einer Vasodilatation resultiert. Der unmittelbare Präkursor von NO ist die Aminosäure Arginin, und das Schlüsselenzym bei seiner Produktion ist NOS [30]. <https://academic.oup.com/view-large/figure/51289309/ef0110417002.jpeg>

Die Endothelzellen produzieren auch Mediatoren, die eine Vasokonstriktion induzieren, einschließlich Endothelin [47–49], Prostaglandinen [50,51] und ANG-II [52–55], und regulieren den Gefäßtonus durch Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Vasodilatation (NO-Produktion) und Vasokonstriktion (z.B. A-II-Erzeugung). Wie oben beschrieben, entsteht NO durch das Enzym NOS, das auf spezifische Aktivatoren und Inhibitoren anspricht.

2.4 Endotheliale Dysfunktion

2.4.1 Definition

Der Begriff "endotheliale Dysfunktion" wurde Mitte der 1980er Jahre definiert, nachdem Furchgott und Zawadzki entdeckten, dass Acetylcholin die Anwesenheit der Endothelzellen erfordert, um den darunter liegenden vaskulären glatten Muskel zu entspannen [3].

Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch eine Verringerung der Bioverfügbarkeit von Vasodilatoren aus, insbesondere Stickstoffmonoxid (NO), während die von Endothel abgeleiteten Kontraktionsfaktoren erhöht werden [56].

Dieses Ungleichgewicht führt zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation, die das funktionelle Merkmal der endothelialen Dysfunktion darstellt [57].

2.4.2 Endotheliale Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis

Die Sepsis ist eine der Hauptursachen für die Mortalität bei schwerkranken Patienten und entwickelt sich als Folge der Reaktion des Wirtes auf eine Infektion. Sepsis kann als generalisierte Entzündungsreaktion des gesamten Organismus definiert werden und manifestiert sich oft als systemisch entzündliches Reaktionssyndrom (SIRS) [58]. Das Fortschreiten von SIRS führt in der Regel zu einer lebensbedrohlichen Dysfunktion mehrerer Organe, was wiederum zu einem Multiorganversagen führt [59]. Die schwerste hämodynamische Manifestation der Sepsis ist ein hyperdynamischer Schock, der durch ein erhöhtes Herzschlagvolumen und den Verlust des peripheren Widerstands gekennzeichnet ist. Dies ist mit einer Fehlverteilung der Durchblutung auf mikrozirkulatorischer Ebene [60] und einem erhöhten arteriovenösen Shunt verbunden.

Im normalen, physiologischen Zustand ist der transvaskuläre Flüssigkeitsstrom stark reguliert. Bei septischem Schock kommt es zum Abbau der endothelialen Barrierefunktion. Der Flüssigkeitsverlust in den extravasalen Raum führt bei septischen Patienten zu lebensbedrohlichen Ödemen in Lungen, Nieren und Gehirn. Die Erhöhung der endothelialen Permeabilität *in vitro* wird durch eine Reihe von Sepsis-bezogener Faktoren (z.B. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) und Lipopolysaccharid (LPS)) induziert [61,62]. Es gibt Hinweise darauf, dass eine LPS-induzierte Erhöhung der endothelialen Permeabilität durch enzymatische Spaltung von Proteinen der Adhäsionsverbindungen (engl. Adherens junction proteins) erreicht wird [62]. Darüber hinaus wurde in einem Schweinemodell des septischen Schocks eine strukturelle Schädigung der Endothelzellen nachgewiesen [63].

2.4.3. Endotheliale Dysfunktion bei okulären Erkrankungen

Die diabetische Retinopathie (DR) ist eine klinisch gut definierte, sehkraftbedrohende, chronische mikrovaskuläre Komplikation von der letztendlich nahezu alle Patienten mit Diabetes mellitus mehr oder weniger betroffen sind [64]. Zudem zählt die diabetische Retinopathie als eine der Hauptursachen für den Visusverlust, insbesondere im arbeitsfähigen Alter [65,66].

In der frühen Phase der diabetischen Retinopathie sind vor allem retinale mikrovaskuläre Endothelzellen durch Störungen ihrer dichten Verbindungen (engl. Tight Junctions (TJs), Adhäsionsverbindungen (Adherens Junctions AJs), Gap Junctions (GJs) usw. geschädigt [67].

Diese Schäden an den retinalen mikrovaskulären Endothelzellen führen in den frühen nicht-proliferativen Stadien zu einer vaskulären Hyperpermeabilität [66] und einem gewissen Grad an Entzündung. Der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und mikrovaskulärer Endothelzellfunktion wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen [68,69].

Die mikrovaskuläre Endothelzellfunktion bei Diabetes mellitus führt zu einer verminderten Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), einer verminderten Bildung und Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [70].

Ebenso führen retinale Venenastverschlüsse, häufige Gefäßerkrankungen der Netzhaut, durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke zu Schädigungen der vaskulären Endothelzellen [71]. Weiterhin wird durch Störungen der Blut-Retina-Schranke und den dadurch bedingten Austritt von Flüssigkeit aus abnormen Netzhautkapillaren in die Retina ein Makulaödem verursacht [72].

Eine weitere Erkrankung, die mit vaskulären Regulationsstörungen und Ischämien in Verbindung gebracht wird, ist das Glaukom, das zu den weltweit häufigsten Ursachen für Erblindung zählt [73].

Der Begriff „Glaukom“ beschreibt eine Gruppe von okulären Störungen mit multifaktorieller Ätiologie, deren klinisch gemeinsamer Charakter eine Neuropathie des Nervus optikus ist [74].

Das vaskuläre Endothel spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des okulären Blutflusses. Somit können pathologische Veränderungen der Endothelzellen eine Ischämie mit Funktionsstörung des betroffenen Gewebes induzieren [75].

Die intrazellulären Signale werden im Allgemeinen durch chemische Botenstoffe, wie Hormone und Neurotransmitter vermittelt, die als sekundäre Botenstoffe fungieren. Stickstoffmonoxid (Nitric oxide = NO) und Endothelin-1 sind im Zusammenhang der biochemischen Kommunikation zwei zelluläre Mediatoren, die primär als Hormone oder Neurotransmitter wirken [76].

Im Auge sind sowohl NO als auch Endothelin-1 an der Regulierung des Augeninnendrucks [77] der lokalen Modulation des Augenblutflusses [48,78,79] und mit NO allein an der Kontrolle des retinalen Ganglienzelltodes durch Apoptose beteiligt [80].

Es wurde ermittelt, dass die vaskulären Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen selbst NO produzieren können, welches eine lokale Entspannung der glatten Muskelzellen induziert [3].

Die Stimulation eines Membranrezeptors auf der Oberfläche von Endothelzellen durch einen Agonisten (z.B. Acetylcholin) führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziums, das wiederum das Enzym der endothelialen Stickoxid-Synthase (eNOS oder NOSIII) aktiviert, um die NO-Produktion zu fördern, was in ihrer Folge zur Entspannung der darunter liegenden glatten Muskelzellen und damit zur Vasodilatation führt [81].

Auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen kann sich derselbe Agonist, z.B. Acetylcholin, auch gegenseitig mit einem Rezeptor beeinflussen und in ähnlicher Weise die intrazelluläre Konzentration von Kalzium erhöhen, was zur Kontraktion der glatten Muskelzellen führen kann. Unter normalen Bedingungen wird diese gefäßverengende Wirkung durch die starke entspannende Wirkung von NO ausgeglichen, während unter bestimmten pathologischen Bedingungen, z.B. bei einer endothelialen Dysfunktion und einem Rückgang der NO-Produktion, beobachtet werden kann, dass ein solcher Agonist eine lokale Vasokonstriktion anstelle einer Entspannung hervorrufen kann [3].

Andererseits kann die lokale Produktion von Endothelin-1 (ET-1) auch zu einer vasospastischen Reaktion führen. So kann beispielsweise in einigen Gefäßen der Endothelinsignalweg durch oxidiertes LDL, eine mit Hypercholesterinämie assoziierte

Substanz, aktiviert werden. Tatsächlich konnten in der isolierten Ziliararterie nach Exposition gegenüber oxidiertem LDL anhaltende Kontraktionen beobachtet werden. Die Kontraktionen wurden entweder durch die Entfernung von Endothelzellen oder durch eine Vorbehandlung mit einem ET-1-Rezeptor-Antagonisten verhindert.

Es wurde auch berichtet, dass bei Glaukompatienten die Endothelinwerte im Kammerwasser deutlich höher als in Patienten der Kontrollgruppe waren [82] während bei der histologischen Präparation des vorderen Augenabschnitts von Glaukompatienten eine Reduktion der Reaktivität von NADHP-Diaphorase, eines indirekten Markers für die NO-Produktion, beobachtet worden ist [83,84]. Daher wird vermutet, dass die physiologischen Modulatoren, NO und Endothelin-1, für den Anstieg des Augeninnendrucks direkt verantwortlich sein könnten, wenn das Gleichgewicht zwischen den beiden Modulatoren, entweder durch die pathologisch verminderte NO-Synthese oder durch die exzessive Freisetzung von Endothelin-1, gestört ist [85].

2.5 Liraglutid

2.5.1 Substanzeigenschaften

Glukagon-like-peptid-1 (Glp-1) ist ein menschliches Inkretin-Hormon, welches in enteroendokrinen L-Zellen im distalen Dünndarm produziert wird [86].

Liraglutid ist ein Glukagon-like Peptid-1 (GLP-1)-Analogon, das wie das native gastrointestinale Hormon (Inkretin) die Insulinsekretion erhöht. Es entspricht nativem GLP-1 mit 97% Aminosäuresequenzhomologie nahezu [87].

Da es durch die Bindung an seine Rezeptoren eine postprandiale Insulinsekretion, eine Hemmung von Glukagon sowie eine Erhöhung der Empfindlichkeit von Insulinrezeptoren zum Insulin fordert und somit eine optimale Einstellung des Blutzuckerspiegels schafft [86,88,89], sind die Glp-1-Analoga eines der neueren in der Therapie des Diabetes mellitus eingesetzten Medikamente [90,91].

Zusätzlich zu seiner hypoglykämischen Wirkung hat GLP-1 eine anti-inflammatorische, antioxidative, neuroregenerative und vaskulär-protective Wirkungen in verschiedenen Zellen und Geweben [92].

GLP-1- und GLP-1R-Agonisten schützen vor Glutamat-induziertem neuronalen Tod sowie vor Schädigungen des Schlaganfalls [93,94].

Da GLP-1 die Insulinausschüttung aus der Bauchspeicheldrüse bei Hyperglykämieepisodes positiv beeinflusst, wurde eine Reihe von langfristigen GLP-1-Agonisten wie Exendin-4, Liraglutid, and Lixisenatid zur Behandlung von Typ-2-Diabetes entwickelt [89].

Es ist in einer Reihe von präklinischen Studien festgestellt worden, dass das GLP-1-Analogon Liraglutid die Blut-Hirn-Schranke passiert und eine Reihe von neuroprotektiven Effekten ausübt, z.B. Schutz der Gedächtnisbildung in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit. Es wird ein Schutz der synaptischen Plastizität im Hippocampus, Prävention von Synapsenverlust und eine Reduzierung des Amyloid-Plaques-Wertes und des löslichen Amyloid-Oligomer-Wertes [20,95] schließlich durch eine Reduktion der chronischen Entzündungsreaktion im Gehirn vermutet [21,96].

Liraglutid übt eine ausgeprägte antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen durch Hemmung der Protein-Kinase C- α (PKC- α), der NADPH-Oxidase, des NF- κ B-Signalweges und durch die vermehrte Expression von protektiven antioxidativen Enzymen aus [19,97].

2.5.2 Vaskuläre Wirkungen von Liraglutid

Für das erste Mal konnte durch Nyström demonstriert werden, dass GLP-1 die endotheliale Dysfunktion bei Typ-2-Diabetikern mit einer etablierten koronaren Herzkrankheit verbessert [98]. Dieser nützliche vaskuläre Effekt von GLP-1 fügt eine weitere positive Eigenschaft des Peptids hinzu und erhöht seinen klinischen Nutzen bei Typ-2-Diabetes-Patienten, bei denen eine endotheliale Dysfunktion ein wesentliches Merkmal ist, das sich negativ auf das Überleben auswirkt.

In einer Studie zeigten Probanden mit Typ-2-Diabetes eine schlechte Reaktion der flussvermittelten Vasodilatation, die auf eine schwere endotheliale Dysfunktion hindeutet [98].

Yu und Kollegen zeigten, dass die Infusion von GLP-1 die Endothelfunktion in einem salzempfindlichen Ratten-Bluthochdruckmodell verbessert [17]. Die Endothelfunktion als Reaktion auf reaktive Hyperämie kann zuverlässig mit Ultraschall gemessen werden. Sie wird als NO-vermittelt angesehen [99]. Darüber hinaus korreliert die endotheliale Dysfunktion der flussvermittelten Vasodilatation in der A. brachialis hochgradig mit der endothelialen Dysfunktion im koronaren Kreislauf [100].

Die endotheliale Dysfunktion ist stark mit der Insulinresistenz und dem Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert und kann möglicherweise die Angiopathie verursachen, die für diese schwächende Krankheit typisch ist [101].

Es ist bekannt, dass Typ-2-Diabetes-Patienten durch eine gestörte endothelabhängige Relaxation gekennzeichnet sind, die eine Folge einer gestörten NO-Synthese, einem erhöhten NO-Verbrauch oder einer Kombination davon sein kann [30].

3. Material und Methoden

3.1 Material

Chemikalien und gefäßaktive Substanzen

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Acetylcholin | SIGMA-ALDRICH |
| Dihydroethidium DHE | DHE, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Dimethylsulfoxid Rotidry®Sept >99,8% (<100 ppm H ₂ O) | Carl Roth GmbH + CO.KG 76185 Karlsruhe |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline < [-] CaCl ₂ / [-] MgCl ₂ > | Gibco |
| Phenylephrine hydrochloride | SIGMA Life Science |
| Sodium Nitroprusside Dihydrate | SIGMA-ALDRICH |

| Name | Hersteller |
|--|--|
| Brutschrank VWR® INCU-Line® | VWR, Leuven, Belgien |
| Custom Glass Tubing | Drummond Scientific Company, Broomall, USA |
| Safe-LockTubes 2.0 mL | Eppendorf Tubes, Hamburg, DE |
| Gefrierschrank, -20°C | Liebherr, Biberach, DE |
| Gefrierschrank, -80°C | Heraeus, Hanau, DE |
| Kryosat Leica CM 1850 | Leica Mikrosystem, Wetzlar, DE |
| Kühlschrank | Liebherr, Bulle, Schweiz |
| Mikroskop Olympus SZ61 | Olympus Optical Co., Hamburg, DE |
| Mikropipetten | Finnpipetten Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Mikroskop Vanox-T | Olympus Optical Co., Hamburg, DE |
| Nikon Camera Head DS-Fi1 | Nikon GmbH, Düsseldorf, DE |
| Nikon Fluoreszenz Mikroskop Eclipse TS 100 | Nikon GmbH, Düsseldorf, DE |
| Nikon Intensilight Epi-fluorescence Illuminator C-HGFI | Nikon GmbH, Düsseldorf, DE |
| Nikon Mikroskop Camera DS-Fi1 | Nikon GmbH, Düsseldorf, DE |
| Objekträger Superfrost Plus | Menzel, Braunschweig, DE |
| Tuberkulin Spritzen | Braun, Melsungen, DE |

3.1.1 Phenylephrin

Phenylephrin ist ein direkt wirkendes Sympathomimetikum. Seine Wirkung übt es durch Aktivierung von α_1 -Adrenozeptoren aus, wobei es keine Subtypeselektivität aufweist. In der Augenheilkunde wird es als Mydriatikum verwendet, da es α_1 -Adrenozeptoren auf dem Musculus dilatator pupillae aktiviert.

Die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Die Hydrolyse von membrangebundenen Polyphosphoinositiden via Phospholipase C führt zur Bildung der zwei sekundären Botenstoffe Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). DAG aktiviert die Proteinkinase C und IP_3 führt zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung, was in ihrer Folge bei fast allen Geweben mit glatter Muskulatur und somit auch bei der glatten Muskelschicht der Gefäße zu einer Kontraktion führt [102].

3.1.2 Natriumnitroprussid

Natrium-Nitroprussid hat eine starke gefäßerweiternde Wirkung in Arteriolen und Venolen. Es wird im Kreislauf durch die Bindung an Oxyhämoglobin zu Zyanid, Methämoglobin und Stickoxid (engl. Nitric Oxide = NO) gespalten [103]. - NO aktiviert die lösliche Guanylatcyclyase in der glatten Gefäßmuskulatur und erhöht die intrazelluläre Produktion von cGMP (engl. cyclic guanosine monophosphate). cGMP aktiviert die Proteinkinase G, die wiederum Phosphatasen aktiviert, die in ihrer Folge Myosin-Leichtketten inaktivieren. Die Myosin-Leichtketten sind an der Muskelkontraktion beteiligt und führen durch ihre Inaktivierung zur Entspannung der glatten Muskulatur im Gefäß, was am Ende die Gefäßdilatation ermöglicht [104].

3.1.3 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem und zugleich ein Autakoid [105,106].

Die vielen wichtigen physiologischen Wirkungen von Acetylcholin werden durch seine Bindung an zwei verschiedene Klassen von Plasmamembranrezeptoren ausgelöst: die nikotinischen und die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Während die nikotinischen Rezeptoren als Acetylcholin-gesteuerte Kationenkanäle fungieren, sind die muskarinischen Rezeptoren typischerweise Mitglieder der Überfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. [105,107].

Ferner ist Acetylcholin durch die Verbindung an seinen muskarinischen Rezeptoren in dem Gefäßendothel in der Lage, die meisten Gefäßbetten zu erweitern [3,108].

Die Wirkungen von Acetylcholin werden durch fünf molekular unterschiedliche Subtypen von seinen muskarinischen Rezeptoren (M_1 - M_2 - M_3 - M_4 - M_5) vermittelt [105,107].

Bei der Gefäßreaktivität spielt insbesondere der M₃-Rezeptorsubtyp eine bedeutende Rolle, da dieser in sehr vielen Gefäßgebieten inklusive denen des Auges sowohl auf dem Endothel als auch im Gefäßmuskel exprimiert wird [105,107,109].

3.2 Sepsismodell der Maus

Alle Experimente erfolgten *in vitro* an männlichen Wildtypmäusen des C57BL/6J-Hintergrundes. Die Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsklinik Mainz sowie des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz (Koblenz, Deutschland; Genehmigungsnummer: 23 177-07/G 14-1-039) wurde erteilt. Mit jeweils 6 Mäusen pro Gruppe wurden die Mäuse in 3 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde als Kontrollgruppe eingesetzt, während bei den übrigen Gruppen eine Sepsis durch Ligatur and Punktion des Blinddarms verursacht wurde. Dabei ist der Blinddarm direkt unter der Ileocecal Klappe abgebunden und dann mit Hilfe einer Nadel punktiert worden. Danach wurden die beiden Gruppen für 48 Stunden in der Sepsis belassen. Bei einer von den beiden Sepsis-Gruppen wurde Liraglutid 100µg/kg Körpergewicht drei Tage lang vor und während der induzierten Sepsis 2x täglich intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

3.3 Funktionelle Untersuchung an Gefäßen der murinen Arteria Ophthalmica

Nachdem die für die Experimente verwendeten Mäuse getötet worden sind, wurden als erstes die Aa. ophthalmicae isoliert (Siehe Abb. 3.1 und 3.2) und jeweils zwischen zwei Kapillarspitzen in einer mit kalter frischer Krebs-Henseleit-Lösung ausgefüllten Perfusionskammer aufgespannt (Siehe Abb. 3.3). Mittels Videomikroskopie wurde die Ansprechbarkeit der Gefäßsegmente gegenüber den Gefäßaktiven Substanzen, Phenylephrin, Acetylcholin und Nitroprussid untersucht, wobei die Änderung des luminalen Gefäßdurchmessers für jede Konzentration bestimmt wurde.

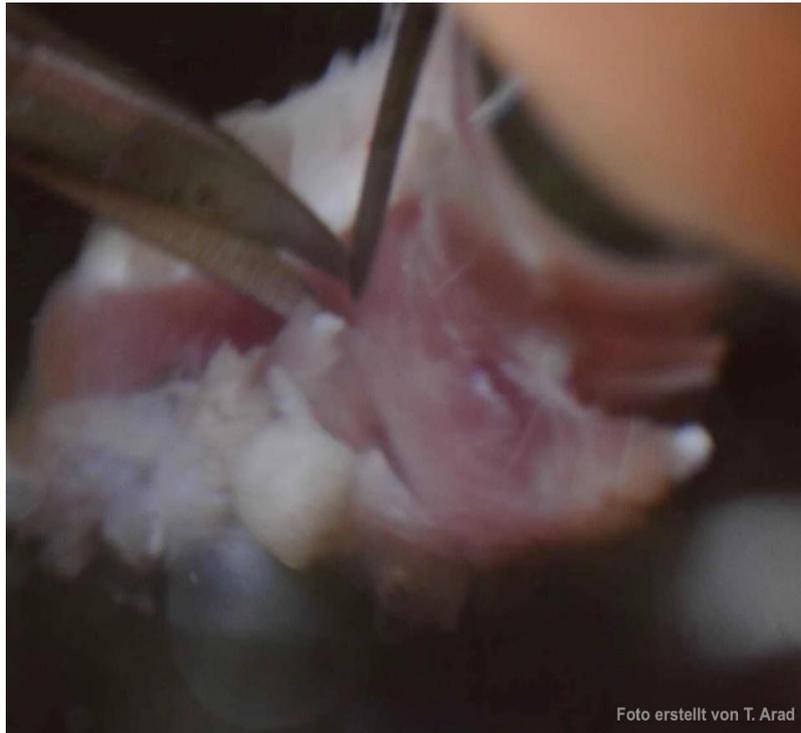


Abb.3.3.1: Präparation der Orbitastrukturen



Abb.3.3.2: Entfernen benachbarter Gewebe der A. ophthalmica

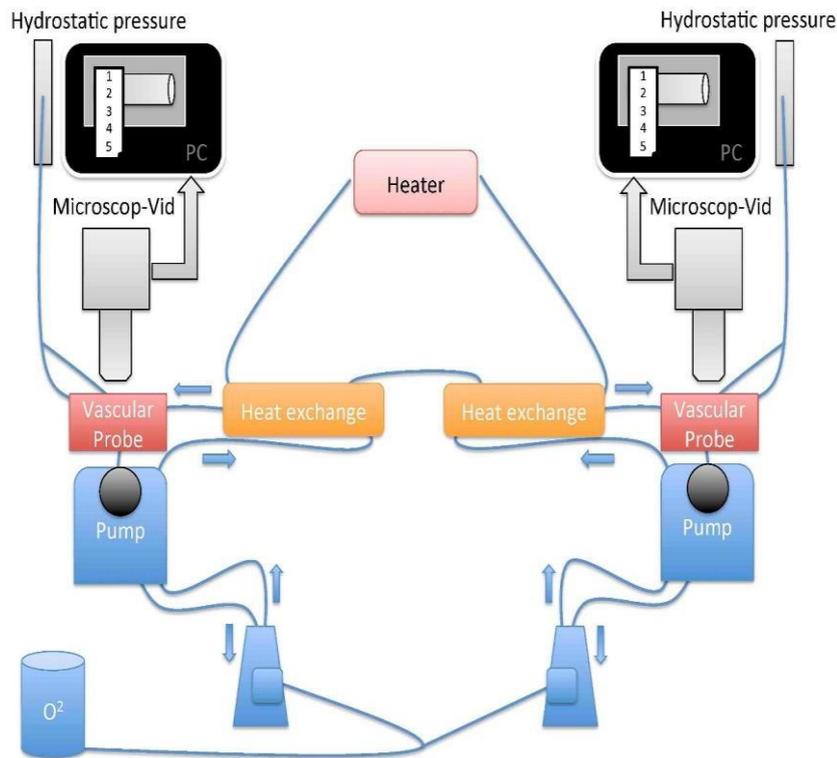


Abb.3.3.3: Duales Kreislauf-Nährsystem

3.4 Quantifizierung reaktiver Sauerstoffverbindungen am Gewebeschnitt

DHE-Färbung

Die DHE-Lösung wurde nach erfolgter Verdünnungsreihe (1 ml Lösung/Eppendorfgefäß) für die Färbung verwendet.

- Die isolierte Arteria ophthalmica wurde in Tissue-Tek (SAKURA O.C.T COMPOUND) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.
- Als nächstes wurden pro Objektträger mehrere Schnitte (10 µm pro Schnitt) von der bei -20° Grad gelagerten und in Tissue-Tek eingefrorenen Blöcken mit der vorher eingeschalteten Kryomaschine (LEICA CM1850) bei -30° Grad vorbereitet und eingefroren.
- In einer Feuchtkammer wurde ein Objektträger platziert und in abgedunkeltem Raum DHE Lsg. (IV) vorsichtig über die Schnitte gegeben (1 ml/Objektträger im gefrorenen Zustand).
- Danach wurde die Feuchtkammer geschlossen und 30 min in einem Wärmeschrank bei 37° Grad (VWR INCU-Line) inkubiert.

- Nach genau 30 min wurde die Kammer aus dem Wärmeschrank genommen, ein Deckglas vorsichtig drübergelegt, den Objektträger in die Mappe gelegt und zum Fluoreszenzmikroskop zum Abfotografieren genommen.

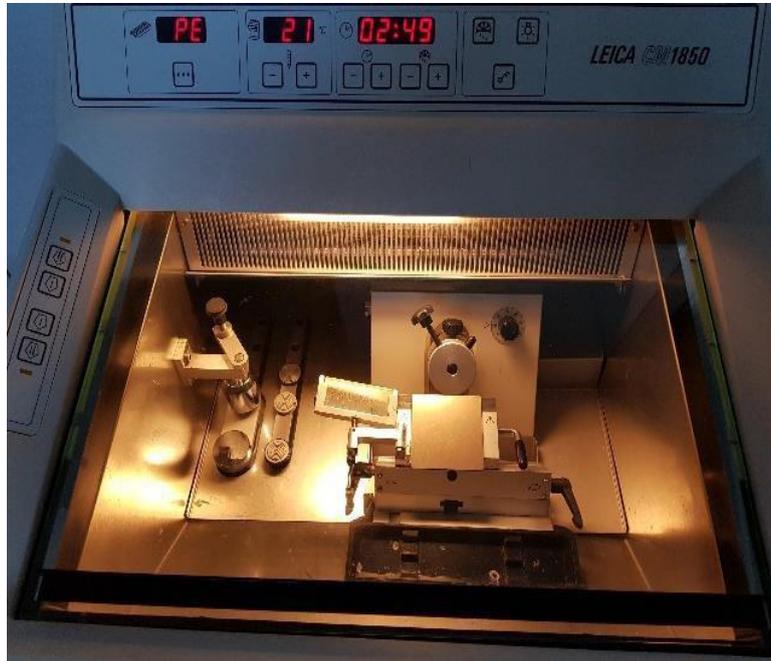


Abb.3.4.1: Vorbereitung der Kryoschnitte für die DHE-Färbung



Abb.3.4.2: Bewahrung der Kryoschnitte mit DHE im Inkubationsschrank unter 37° für 30 Minuten.

3.5 Statistik

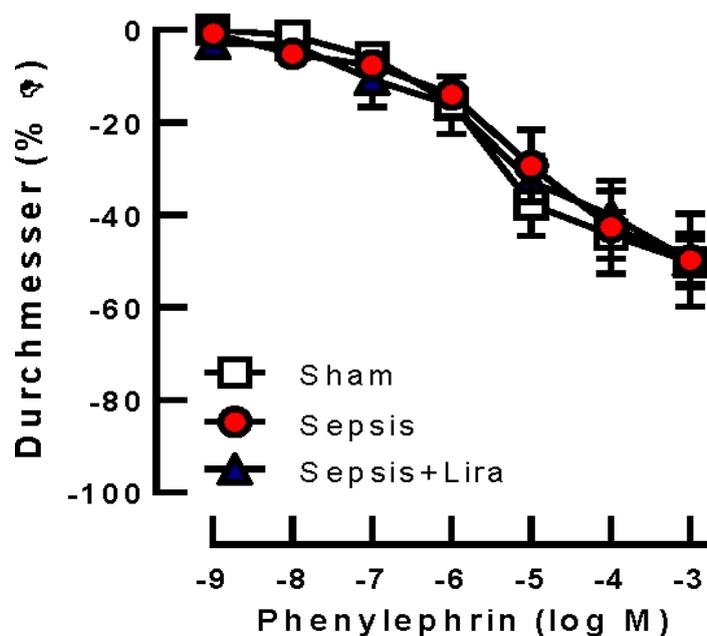
Änderungen der Gefäßreaktionen auf verschiedene getestete Substanzen werden als prozentuale Durchmesseränderung von den anfänglichen Vorkontraktionswerten oder den Prozent der Vasodilatatorreaktionen im Vergleich zur maximalen Vasodilatatorreaktion, die durch ACh induziert wird, dargestellt. Die statistische Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Abhängigkeit wurde mit der Zweiweg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen und einem anschließenden Bonferroni-Test durchgeführt. Der Vergleich der DHE-Leuchtintensität erfolgte mit der Einweg-Varianzanalyse und einem anschließenden Tukey-Test. Das Signifikanzniveau α wurde mit 5% festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Funktionelle Untersuchungen der murinen Arteria ophthalmica

4.1.1 Phenylephrin

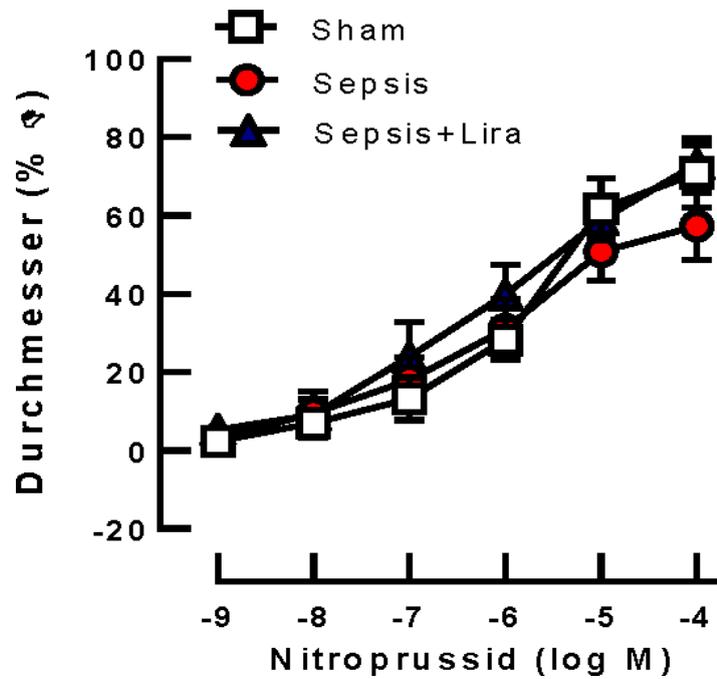
Um zu testen, ob es gruppenabhängige Unterschiede in der vasokonstriktorischen Ansprechbarkeit des Gefäßmuskels gab, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den α_1 -Adrenozeptoragonisten Phenylephrin für den Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-3} M erstellt. In allen drei Gruppen war eine konzentrationsabhängige Abnahme des Gefäßdurchmessers zu verzeichnen, wobei keine Gruppenunterschiede zu verzeichnen waren. Die maximale Reduktion des luminalen Gefäßdurchmessers betrug bei der Konzentration von 10^{-3} M . Phenylephrin-Konzentrationen circa 50%.



Grafik 4.1.1.1: Dosiswirkungskurven des vaskulären Endothels der murinen Arteria ophthalmica gegenüber Phenylephrin in aller untersuchter Gruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe)

4.1.2 Natrium Nitroprussid

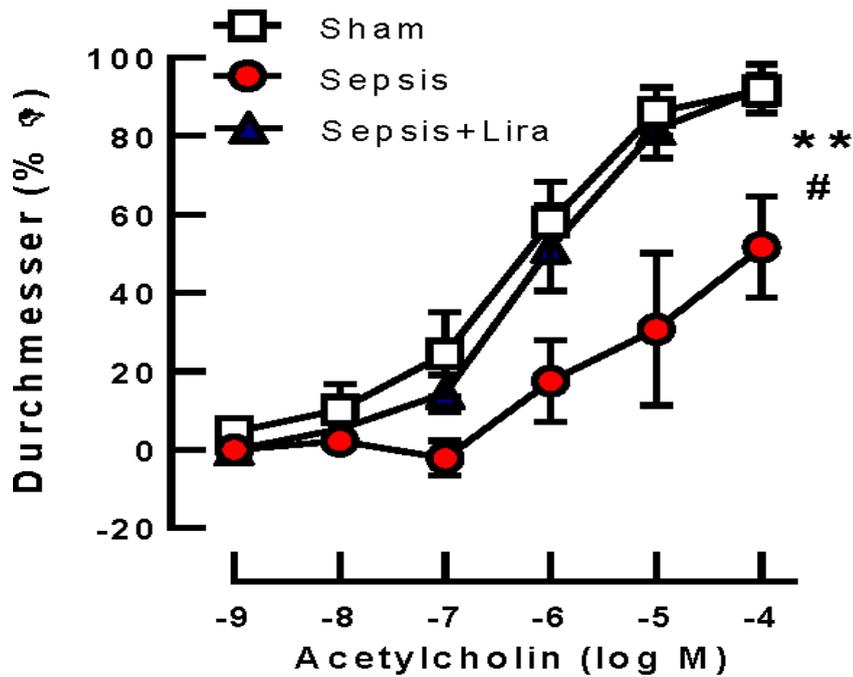
Ebenso zeigte sich hier bei allen untersuchten Gruppen ähnliche vaskuläre Reaktionen der Endothelzellen bei Gabe des endothelunabhängigen Vasodilatators Nitroprussid.



Grafik 4.1.2.1: Die Reaktionskurven des vaskulären Endothels auf den endothelunabhängigen Vasodilatator SNP aller untersuchter Gruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe)

4.1.3 Acetylcholin

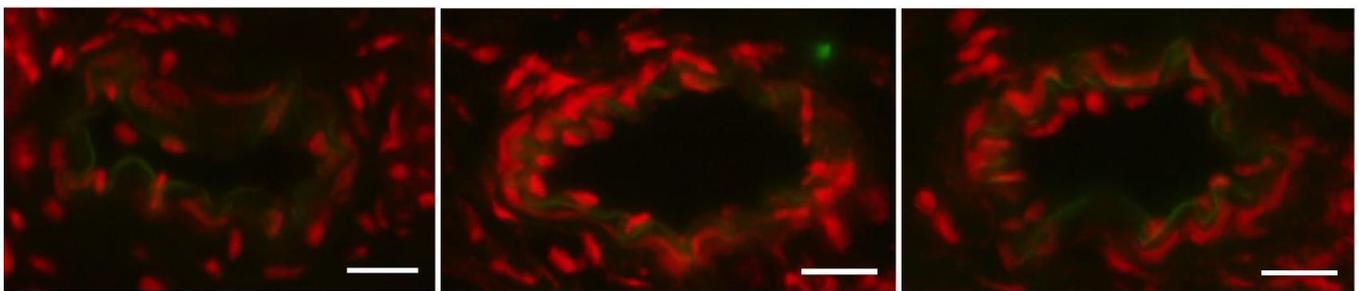
Der endothelabhängige Vasodilatator Acetylcholin induzierte eine konzentrationsabhängige Vasodilatation in allen drei Gruppen. In der Sepsisgruppe fiel die Reaktion jedoch deutlich schwächer aus. Bei einer maximalen Acetylcholinkonzentration von 10^{-4} M betrug die Änderung des luminalen Gefäßdurchmessers 90%.



Grafik 4.1.3.1: Konzentrations-Wirkungskurven der Arteria ophthalmica gegenüber dem endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin

4.2 Detektion von oxidativem Stress an der Arteria ophthalmica mittels DHE-Färbung

Die DHE-Färbung zeigte den oxidativen Stress der Endothelzellen jeweils isolierter Arteria ophthalmica mit Darstellung intensiv fluoreszierender Zellen bei starkem oxidativem Stress (siehe Abbildung 4.1). Es wurde bereits fluorezenzmikroskopisch deutlich, dass die Endothelzellen bei der Sepsis-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Gruppe (Sham) einen deutlich erhöhten oxidativen Stress aufwiesen. Ferner war eine bedeutende Erniedrigung in der Anzahl der gestressten Endothelzellen bei der Liraglutid-Gruppe im Vergleich zur Sepsis-Gruppe deutlich.



Sham

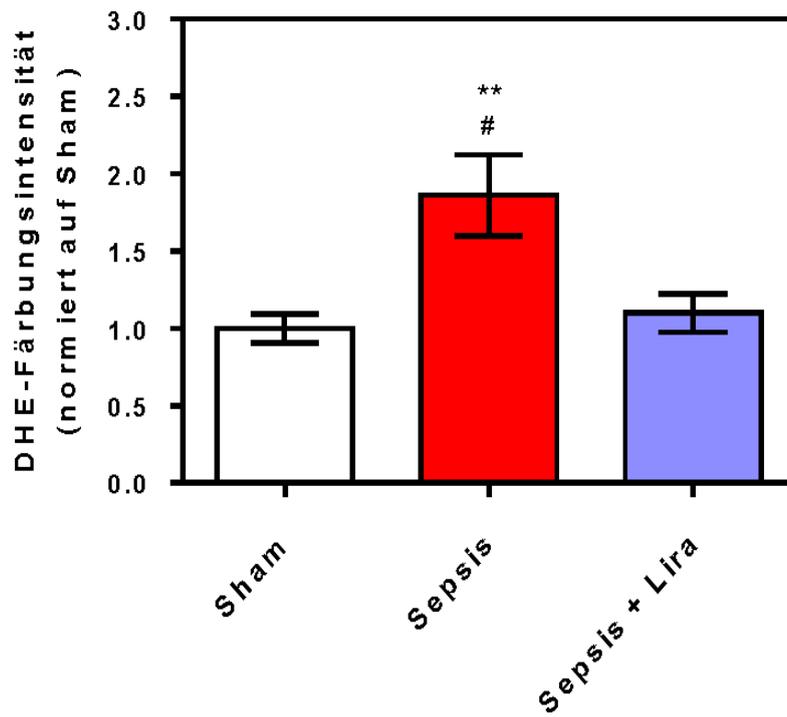
Sepsis

Sepsis + Lira

Abb. 4.2.1: Beispielhafte fluorezenzmikroskopische DHE-Färbungen (rot) zur Darstellung von oxidativem Stress an der murinen Arteria ophthalmica in allen Untersuchungsgruppen. Die Breite der weißen Maßstabsleisten beträgt 30 μm

Desweiteren wird bei Darstellung einer DHE-Färbungsintensität bei den Gruppen dieser Studie deutlich, dass die Sepsis-Gruppe eine auffallend höhere Intensität im Vergleich zu den anderen übrigen Gruppen aufzeigt.

Wie auch an den fluorszenzmikroskopischen Bildern deutlich wurde, ist in der durch Liraglutid behandelten Sepsisgruppe eine im Vergleich zur unbehandelten Sepsisgruppe reduzierte DHE-Fluoreszenzintensität deutlich, was auf eine geringere Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies hindeutet.



Grafik 4.2.2: Darstellung der normierten DHE-Färbungsintensität für die drei Untersuchungsgruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe). ** $p < 0,01$, Sepsis versus Sham; * $p < 0,05$, Sepsis versus Sepsis+Lira

5. Diskussion

In unserer Studie konnten wir am Mausmodell eine vaskuläre Endothedysfunktion der Arteria ophthalmica nach Induktion einer Sepsis feststellen. Die Endothelfunktion konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit Liraglutid erhalten werden. Ebenso ergab sich bei der Sepsis-Gruppe im Gefäßquerschnitt eine erhöhte DHE-Leuchtintensität, was auf eine erhöhte Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen hindeutet. Die Behandlung mit Liraglutid konnte dagegen oxidativen Stress verhindern.

Studien in anderen Gefäßgebieten zeigten, dass Liraglutid, durch die Hemmung des oxidativen Stresses und Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation, die vaskuläre endotheliale Dysfunktion der Mesenterialarterien bei Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 verbessern konnte [110]. In unserer Studie haben wir erstmals an einem okulären Gefäßgebiet eine protektive Rolle von Liraglutid aufzeigen können.

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßdurchmessers, indem es mehrere Substanzen sezerniert, die den Gefäßtonus und die Gefäßstruktur, die Thrombozytenaktivität, die Gerinnungsfaktoren, die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, die Zellmigration und die Proliferation regulieren [111,112].

Das vaskuläre Endothel am Auge reguliert die Durchblutung der Retina, des Sehnervkopfes und der Aderhaut durch die Freisetzung von vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Stoffen als Reaktion auf lokale metabolische Bedürfnisse [113].

Die Verletzung des Endothels ändert seine Regulierungsfunktionen und führt zu einer abnormen Endothelzellfunktion. Eine endotheliale Dysfunktion wurde als ein Ungleichgewicht definiert zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren, zwischen Mediatoren für prokoagulierende und antikoagulierende Substanzen oder wachstumshemmende und wachstumsfördernde Substanzen [114].

Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) charakterisiert, koexistiert mit veränderter vaskulärer Reaktivität, führt zur Entwicklung einer manifesten Atherosklerose [115,116], und ist mit der Entwicklung von kardiovaskulären Krankheitsbildern und einem prothrombotischen oder hyperkoagulierenden Zustand assoziiert [117,118].

Die systemische endotheliale Dysfunktion ist an der Pathogenese verschiedener retinaler und uvealer Gefäßerkrankungen beteiligt, darunter Uveitis [119], Glaukom [119–122], die ein Schlüsselfaktor für die Entwicklung der letztgenannten ist [122].

In Bezug auf den zugrunde liegenden Mechanismus, der die Entwicklung von retinalem Venenverschluss mit arterieller Beeinträchtigung verbindet, wurde argumentiert, dass retinale Venenverschlüsse die Folge der Schädigung des venösen Gefäßendothels und der Intima-Media sind. Genauer gesagt führen turbulenter Blutfluss und größerer Scherstress aufgrund der mechanischen Obstruktion der Vene durch die starre Arterie an der arteriovenösen Kreuzung (Venenastverschluss) oder in der Lamina cribrosa (Zentralretinalvenverschluss) zu einer endothelialen Zellschädigung und Zellproliferation [123,124].

Ebenso manifestiert sich das Glaukom durch eine spezifische Atrophie des Sehnervs, die als glaukomatöse optische Neuropathie bezeichnet wird. Die Pathogenese der glaukomatösen optischen Neuropathie ist nach wie vor nicht verstanden. Noch rätselhafter ist die Pathogenese des Normaldruckglaukoms. Die Pathogenese der glaukomatösen optischen Neuropathie wird seit nunmehr als einem Jahrhundert diskutiert. Derzeit wird die Pathogenese der glaukomatösen optischen Neuropathie insbesondere in zwei Kategorien eingeteilt: die mechanische oder Hochdrucktheorie und die vaskuläre Theorie. Der Nachweis für die Mechanische- bzw. Hochdrucktheorie ist in der wissenschaftlichen Literatur bereits dokumentiert. Die in vielerlei Hinsicht attraktivere vaskuläre Theorie, die sich mit der Grundfrage beschäftigt, ist jedoch durch einen Datenmangel begrenzt. Infolgedessen wurde die Validität der vaskulären Theorie in Frage gestellt [125].

Liraglutid ist ein neuartiges Antidiabetikum aus der Gruppe der GLP-1-Analoga, welcher Gegenstand aktueller Forschung ist und positive pleiotropische Effekte auf das kardiovaskuläre System sowie neuroprotektive Effekte ausüben kann. Es hemmt die Bildung von freien Radikalen, erhöht die Rate der schützenden antioxidativen Enzyme und besitzt somit antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften [126].

Die GLP-1-Rezeptoren sind in der Bauchspeicheldrüse, im Gehirn, im Herzen, in den Nieren und im Magen-Darm-Trakt weit verbreitet [127–131], einschließlich des Magens, wo der Rezeptor auf den Parietalzellen exprimiert wird [132]. Seine Funktion ist nicht für alle diese Orte bekannt.

Immer mehr Studien zeigen, dass GLP-1-Rezeptor-Agonisten nicht nur eine hypoglykämische Wirkung haben, sondern auch das Risiko für unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse verringern können [133,134]. Daher wurden solche Agonisten von der American Diabetes Association für das Management der Glykämie bei Typ-2-Diabetikern mit atherosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen empfohlen [135].

GLP-1-Rezeptor-Agonisten haben nachweislich eine schützende Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System [136,137] und verbessern die Endothelfunktion durch die Aktivierung von GLP-1-Rezeptoren [138,139]. Die Mechanismen, die dem Gefäßschutz durch GLP-1-Rezeptor-Agonisten zugrunde liegen, sind jedoch weiterhin unklar [140].

Eine Studie von Zhai zeigte, dass GLP-1-Rezeptoren auf dem Endothel der Netzhautkapillaren vorhanden sind und dass GLP-1-Rezeptor-Agonisten eine direkte dilatorische Wirkung auf den Kapillartonus haben [141].

In der ganz montierten Netzhaut normaler Ratten wurden GLP-1-Rezeptoren in Endothelzellen der Netzhautkapillaren nachgewiesen. Darüber hinaus wurden GLP-1-Rezeptoren in kultivierten HRMECs, nicht aber in HRPes exprimiert. In einigen Studien wurden GLP-1-Rezeptoren in vaskulären Endothelzellen von Geweben wie dem Herzen [142] und den Umbilikalvenen [143] nachgewiesen.

Diese positiven Eigenschaften wollten wir in dieser Studie hinsichtlich ihrer Wirkung am Tiermodell der Arteria Ophthalmica überprüfen. Unsere Hypothese ist, dass Liraglutid eine deutlich verbesserte Wirkung auf das vaskuläre System und den Organismus haben kann. Hierzu wurde ein nach Simulationsmodell der Erkrankungen mit vaskulärer Endotheldysfunktion als Sepsismodell der Maus angewandt.

5.1 Reaktion der Endothelzellen auf Stressfaktoren

Es ist bekannt, dass das Gefäßendothel ein aktives parakrines, endokrines und autokrines Organ, für die Regulierung des vaskulären Tonus und Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase unerlässlich ist [26].

Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch eine Verringerung der Bioverfügbarkeit von Vasodilatoren aus, insbesondere Stickstoffmonoxid (NO), während die von Endothel abgeleiteten Kontraktionsfaktoren erhöht werden [56].

Dieses Ungleichgewicht führt zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation, die das funktionelle Merkmal der endothelialen Dysfunktion darstellt [57].

Bei den allermeisten Risikofaktoren, welche mit atherosklerotischer und kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität zusammenhängen, wurden ein Zusammenhang zu endothelialer Dysfunktion festgestellt. Viele dieser Risikofaktoren, einschließlich Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Diabetes und Rauchen, sind mit einer Überproduktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen assoziiert [144]. Durch ihre Reaktion mit NO können reaktive Sauerstoffspezies die Bioverfügbarkeit von NO im Gefäßbereich verringern und Zellschäden fördern [145].

Daher gilt erhöhter oxidativer Stress als ein wichtiger Mechanismus, der an der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion beteiligt ist, und als ein gemeinsamer pathogener Mechanismus der Wirkung von Risikofaktoren auf das Endothel betrachtet wird [145].

Einige Studien zeigen zudem, dass das Risiko für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mit der Anzahl der in einem Individuum vorhandenen Risikofaktoren steigt [146].

Es kann angenommen werden, dass das Potenzial zur Veränderung der Endothelfunktion zwischen verschiedenen Risikofaktoren variiert. Somit kann tituliert werden, dass bestimmte Gruppen von Risikofaktoren, wie sie bei Patienten mit metabolischem Syndrom beobachtet werden, einen größeren Einfluss auf die Endothelfunktion haben können als andere Kombinationen von Risikofaktoren. Das Vorliegen etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren ist jedoch nicht die einzige Determinante der Endothelfunktion. Dieses kann durch die Beobachtung aufgezeigt werden, dass sich Personen mit normaler Endothelfunktion und Patienten mit verschiedenen Stadien der endothelialen Dysfunktion nicht unbedingt in ihrem Risikofaktorprofil unterscheiden [147].

Obwohl lokale Faktoren, insbesondere hämodynamische Kräfte wie Scherstress, als wichtige Modulatoren der endothelialen Funktion anerkannt wurden und daher die lokale endotheliale Homöostase beeinflussen können, deuten diese Ergebnisse auf eine variable endotheliale Anfälligkeit einzelner Patienten für kardiovaskuläre Risikofaktoren hin. Desweiteren unterstreichen sie die Bedeutung anderer bisher unbekannter Faktoren, einschließlich der genetischen Disposition, sowohl für die Prävention als auch für die Progression der endothelialen Dysfunktion [144].

Zusammenfassend stellt der Status der Endothelfunktion einen integrierten Index dar, der sowohl die Gesamtlast der kardiovaskulären Risikofaktoren als auch die Summe aller vaskuloprotektiven Faktoren eines jeden Individuums umfasst. Darüber hinaus kann die endotheliale Dysfunktion aufgrund ihrer zentralen Rolle im atherogenen Prozess als das "ultimative Risiko der Risikofaktoren" angesehen werden, welches auf das Vorliegen eines spezifischen atherogenen vaskulären Milieus hinweist [148].

Das Endothelin (ET) weist eine starke und anhaltende vasokonstriktorische und vasopressorische Aktivität auf. ET hat zwei Funktionen: erstens als zirkulierendes Hormon und zweitens als parakriner Faktor, der hauptsächlich an der Regulation des Gefäßsystems und des systemischen Blutdrucks beteiligt ist [149,150].

Die ET-Produktion wird durch Substanzen wie Adrenalin, IL-1, Thrombin und durch Bedingungen wie Scherstress und Schäden an ECs induziert. Die ET-Familie besteht aus drei verschiedenen Isoeptiden, ET-1, ET-2 und ET-3, die von drei verschiedenen Genen abgeleitet sind. ET-1 ist der stärkste Vasokonstriktor von allen drei. Es wird als ein viel längeres Polypeptid Preproendothelin synthetisiert, das 203 Aminosäurereste lang ist. Preproendothelin wird durch eine Signalpeptidase zu proET-1 gespalten, die wiederum durch ET-Konvertierungsenzym (ECE) in die 21 Aminosäuren lange ET-1 gespalten wird [151–156].

5.1.1 Reaktionen der vaskulären Endothelzellen auf den oxidativen Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“, wie er vor 30 Jahren intuitiv definiert wurde, dient als Konzept in der Redox-Biologie und Medizin [157].

Es handelt sich dabei um einen Überschuss an pro-oxidativen Faktoren (ROS und RNS) über Antioxidantien. Sowohl ROS als auch RNS sind entweder freie Radikale oder Stoffe, die bei der Interaktion mit verschiedenen Zellkomponenten freie Radikale bilden. Freie Radikale haben ein nicht-gekoppeltes Elektron und sind instabil und hochreaktiv. Ein freies Radikal reagiert mit empfindlichen Komponenten, einschließlich Lipiden, Proteinen und/oder DNS. Alle diese Reaktionen führen zur Bildung eines neuen freien Radikals, also zu einer Kettenreaktion mit freiem Radikal, die sich so lange ausbreitet, bis die Kettenreaktion durch das Abschrecken als Bi-Radikal beendet ist. Die Geschwindigkeitskonstante des bi-radikalischen Löschens ist höher als sie bei den Reaktionen zwischen freien Radikalen und anderen Zellkomponenten ausfällt, so dass die Konzentration der freien Radikale niedrig bleibt. Dennoch reagieren freie Radikale mit anderen Komponenten recht schnell und ihre Produkte verursachen oxidative Schäden.

Obwohl solche Schäden durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit freien Radikalen entstehen können, ist die gemeinsame Folge eine übermäßige Konzentration von freien Radikalen, dass immer Schäden verursacht werden, was mit Harman's "Free Radical theory of aging" übereinstimmt [158]. Freie Radikale und oxidativer Stress wurden demnach für viele kardiovaskuläre als auch neurodegenerative Krankheiten, verantwortlich gemacht [159].

In Bezug auf die ursprüngliche Definition von oxidativem Stress ist in der Zelle das Resultat einer pathologisch vermehrten Bildung von freien Radikalen und anderen Oxidantien, einer reduzierten Konzentration von niedermolekularen Antioxidantien oder einer Aktivitätsstörung der anti-oxidativen Enzyme zu verzeichnen. Angesichts der vermuteten Beteiligung von oxidativem Stress an einer Vielzahl von Pathologien wurden Antioxidantien daher zu einer vielversprechenden Einflussgröße, verschiedenste Krankheiten zu verhindern oder sogar zu heilen [160].

Bevor der endothelium-derived relaxing Faktor (EDRF) als Stickoxid bekannt war, wurde bereits gezeigt, dass seine biologische Halbwertszeit durch Sauerstoff verringert und durch die Verabreichung von Superoxiddismutase (SOD) verlängert werden konnte [161].

Nachdem dann festgestellt wurde, dass es sich bei EDRF um Stickoxid (NO-) handelte, ist deutlich geworden, wie diese Redox-Chemie auftreten konnte.

Die ersten Erkrankungen, die als assoziiert mit abnormalen endothelabhängigen Gefäßrelaxationen detektiert wurden, waren Hypercholesterinämie und Atherosklerose. Dieses wurde ursprünglich Mitte der 80er Jahre bei cholesteringesättigten Kaninchen, Affen mit diätetisch bedingter Atherosklerose und bei Menschen mit Atherosklerose beobachtet [162].

Mehrere Faktoren, die für veränderte endothelabhängige Gefäßrelaxationen bei Hypercholesterinämie und Atherosklerose verantwortlich sind, wurden identifiziert, jedoch ist ein wichtiger Mechanismus die eindeutig oxidative Inaktivierung von NO durch verstärkte Produktion von Sauerstoff [163].

Es wurde dargelegt, dass Gefäße dieser Tiere große Mengen an vasoinktiven Stickoxiden in Form von Nitrit und Nitrat produzieren, wahrscheinlich wegen des oxidativen Abbaus von Stickoxid. Die Produktion dieser Stickoxide nahm als Reaktion auf Acetylcholin zu.

Sepsis kann als generalisierte Entzündungsreaktion des gesamten Organismus definiert werden und manifestiert sich oft als systemisch inflammatorisches Reaktionssyndrom (SIRS) [58].

Die Progression von SIRS führt in der Regel zu einer lebensbedrohlichen Multiorgan-Dysfunktion, die in ein Multiorganversagen (MOF) mündet [59]. Die Pathogenese der Sepsis ist das Ergebnis eines komplexen Netzwerks von Ereignissen. Komponenten der gramnegativen bakteriellen Zellwand (Endotoxine) sind die dominierende Spezies, die für die Auslösung der Sepsis verantwortlich sind [164]. Endotoxine lösen neben anderen bakteriellen Molekülen eine generalisierte Reaktion aus, die sowohl zelluläre als auch humorale Wege mit der Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren beinhaltet. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine, Koagulationsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, myokardiale Depressiva und Hitzeschockproteine [165].

Das Endothel ist ein Hauptangriffspunkt von Sepsis-induzierten Ereignissen und Endothelzellschäden, welches einen Großteil der Pathologie des septischen Schocks ausmacht [166]. Die vaskulären Endothelzellen gehören zu den ersten Zellen im Körper, die mit zirkulierenden Bakterienmolekülen in Kontakt kommen. Endothelzellen besitzen Mechanismen, die strukturelle Merkmale bakterieller Pathogene erkennen und anschließend die Expression von Entzündungsmediatoren starten [167].

Die zelluläre Reaktion auf bakterielle Toxine bietet in der Regel Schutz vor Mikroorganismus-bedingten Infektionen. Die pathologische Übererregung dieser Reaktionen kann nämlich zu massiven Schäden führen und somit eine gestörte Endothelfunktion des Gefäßsystems induzieren. Unter normalen Bedingungen steht die biologische Aktivität von Sepsis-induzierten Mediatoren unter der strengen Kontrolle spezifischer Inhibitoren. Bei der Sepsis wird dieses Gleichgewicht gestört und die Störung manifestiert sich durch tiefgreifende Veränderungen in der relativen Produktion verschiedener Mediatoren. Daher kann die Pathogenese der Sepsis als pro- und antiinflammatorisches Ungleichgewichtssyndrom beschrieben werden [168].

5.1.2 Oxidativer Stress und der Nuklearfaktor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Signalweg

Reaktive Sauerstoffverbindungen (engl. reactive oxygen species, ROS) werden entweder durch den normalen zellulären Metabolismus im Peroxisom und in den Mitochondrien oder durch exogene Auslöser, wie inflammatorische Zytokine, chemische Oxidantien, ionisierende Strahlung, und Toxine, erzeugt. Unter homeostatischen Bedingungen liegen die ROS-Spiegel

durch das Aufrechterhalten des Gleichgewichts zwischen ihrer Produktion und ihrer Eliminierung bei einem niedrigen Niveau [169].

Das Versagen der Eliminierungsmechanismen führt hingegen zu einer exzessiven Produktion von ROS in Form von Superoxid Anionen (O_2^-), Hydroxylradikalen ($-OH$), and Hydrogenperoxiden (H_2O_2). Die exzessive ROS-Produktion zerstört Nukleotide, Proteine und Lipide und beeinträchtigt somit die Funktion dieser Biomoleküle [170,171].

Obwohl ROS wichtige Signalisierungsmoleküle für verschiedene biologische Prozesse darstellen, verursachen übermäßige ROS oxidativen Stress und tragen zum Altern und zu vielen pathologischen Zuständen bei, darunter Krebs, Diabetes, neurologische Störungen, Atherosklerose, arterielle Hypertonie, Ischämie/Perfusion und Asthma. [172–174].

Zu den antioxidativen Systemen gehören enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien, die normalerweise wirksam bei der Neutralisierung von hochreaktiven ROS sind. Nicht-enzymatische Antioxidantien sind Glutathion, Ascorbinsäure und Tocopherol sowie viele phenolische Mischungen aus Naturprodukten [175]. Ein Schlüsselmolekül, das die zelluläre antioxidative Reaktion reguliert, ist der Nuklear-Faktor Erythroid-2 Related Faktor-2 (Nrf2), einer der Transkriptionsfaktoren in der Zelle [176].

Normalerweise werden die konjugierenden und verwandten Enzyme nicht in ihrer maximalen Kapazität exprimiert, sondern sind durch die Transkriptionsaktivierung und den exzessiven, lang wirkenden und oft katalytischen Schutz vor elektrophilen und oxidativen Schäden hochgradig induzierbar. Die Induktion dieser Schutzreaktion erfordert mindestens drei wesentliche Komponenten:

(a) antioxidative Response-Elemente (AREs) [177], stromaufwärts gelegene Regulatorsequenzen, die auf jedem Gen entweder in einer oder mehreren Kopien existieren;

(b) Nrf2 (nuclear-factor-erythroid 2-related factor 2), der wichtigste Transkriptionsfaktor, der mit Mitgliedern der kleinen Maf-Familie von Transkriptionsfaktoren heterodimerisiert, an das ARE bindet und die allgemeine Transkriptionsmaschinerie zur Expression von ARE-regulierten Genen rekrutiert [178]; und

(c) Keap1 (Kelch ECH assoziiertes Protein 1), ein zytosolisches Repressorprotein, das an Nrf2 bindet, es im Zytoplasma zurückhält und seinen proteasomalen Abbau fördert [176].

Das Keap1-Protein enthält mehrere Cysteinreste mit Sulfhydrylgruppen, die mit ROS reagieren können, wodurch die Bindungen zwischen Nrf2 und Keap1 gebrochen werden. Sobald die Bindungen gebrochen sind, wird Nrf2 bei Ser 40 phosphoryliert und wandert in den Zellkern der Zelle.

Im Nukleus bildet es Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und kleinen Maf-Proteinen und bindet an regulatorische Regionen der DNA, die als ARE bezeichnet werden, die die Transkription von Genen aktivieren, die für antioxidative Enzyme kodieren. c-Jun wirkt hauptsächlich als transkriptioneller Aktivator, während die kleinen Mafs die Gen-Transkription nach der Nrf2-Bindung inaktivieren [179]. Nrf2-ARE-Bindung reguliert die Expression von Genen, die an zellulären antioxidativen und antiinflammatorischen Reaktionen beteiligt sind, wie Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidasen, Thioredoxin, Thioredoxinreduktase, Sulfiredoxin, NADPH:Chinon-Oxidoreduktase-1, Häm-Sauerstoffase-1, Glutathion-Reduktase, Glutaredoxin, Glutamat-Cystein-Ligase, Glutathion-S-Transferase, UDP-Glukuronyl-Transferase, Peroxiredoxin-Sulfotransferase und die γ -Glutamat-Cystein-Ligase katalytische Untereinheit [180].

Zudem aktiviert Nrf2 die Expression von Genen, die die mitochondriale Biogenese und Konservierung fördern, wie beispielsweise mitochondriale Transkriptionsfaktoren, mitochondriale DNA-gesteuerte RNA-Polymerase, Citratsynthase, NADH-Dehydrogenasen und Cox-Untereinheit 1 [181,182].

Darüber hinaus schützt die pharmakologische Aktivierung von Nrf2 durch verschiedene Chemische Schutzmittel vor oxidativen Schäden [183].

5.2 Vaskuläre Veränderungen während der Sepsis

Als Sepsis bezeichnet man eine lebensbedrohliche Situation, bei der das Gleichgewicht zwischen der Sauerstoffversorgung und dem Sauerstoffbedarf im Organismus gestört wird, was zu einem Multiorganversagen durch die resultierte Hypoxie und dadurch letztlich zum Tod führen kann. Während des septischen Schocks produzieren stimulierte Entzündungszellen wie Neutrophile und Makrophagen große Mengen an reaktiven Sauerstoffverbindungen und reaktive Stickstoffspezies (engl. Reactive nitrogen species RNS) (51). Diese Produktion von ROS und RNS ist ein entscheidender Mechanismus für Neutrophile und Makrophagen, um Mikroorganismen zu schädigen oder abzutöten und trägt zu einem Teil der Wirtsabwehr gegen die Verbreitung von Bakterien bei (52). Sauerstoff-Bursts können auch Zellschäden

verursachen, und das Endothel ist eines der ersten Ziele von ROS. Während der Sepsis kann eine große Anzahl von Komponenten (z.B. LPS, Endotoxine, pro- und entzündungshemmende Zytokinbalance, Grad der Leukozytenaktivierung, oszillierender Scherstress usw.) sowie Bedingungen (Hypoxie, Reperfusionsschäden usw.), die für die endotheliale ROS-Produktion verantwortlich sein können (53), (54).

Da es sich bei ROS um hochgiftige Komponenten handelt, wird ihre Produktion durch enzymatisch und nicht-enzymatisch anti-oxidantischen Komponenten streng kontrolliert (55). Bei septischem Schock wurde eine Erhöhung der Stickoxid-Verfügbarkeit beschrieben und auf die Zunahme der iNOS-Aktivität innerhalb der glatten Muskelzellen der Arterie oder der nNOS-Aktivität zurückgeführt (56). Während der Sepsis spielen sie eine Schlüsselrolle bei der nativen Immunantwort und einige von ihnen produzierte oxidierte Stoffe können bei akuten Entzündungszuständen eine schützende Wirkung haben (57). Die Auswirkungen von ROS auf die Endothelzellen sind nicht nur von der Menge und den Produktionsorten abhängig, sondern auch von den Prozessen, die ROS abbauen oder abfangen (58).

Durch die Gleichgewichtsstörung zwischen sowohl den sauerstofffreien Radikalen als auch den reaktiven Stickstoffspezies und dem sowohl enzymatischen als auch nicht-enzymatischen Antioxidanzsystem kommt es während eines septischen Schocks aufgrund des provozierten oxidativen Stresses und somit der vermehrten Gefäßwandpermeabilität zu einer vaskulären Endotheldysfunktion. Dieses konnten wir auch durch unsere Studie nachweisen, indem wir die Reaktion des vaskulären Endothels der Aa. Ophthalmicae bei der Sepsis-Gruppe auf den endothelabhängigen Vasodilatator Acetylcholin untersuchten. Diese war relativ erniedrigt im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen, während diese Reaktion bei derselben Gruppe auf den endothelunabhängigen Vasokonstriktor, Phenylephrin, sowie auf den endothelunabhängigen Vasodilatator, Natrium Nitroprussiat (SNP), unverändert blieb. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Sepsis eine endotheliale Dysfunktion verursacht hat.

Zudem ist die Apoptose der vaskulären Endothelzellen ein wichtiger Faktor, der zu dieser vaskulären Endothelzellstörung führt. In den septischen Gefäßen wird die Homöostase der vaskulären Endothelzellen beeinträchtigt und die Apoptose schreitet durch den Abbau der schlechten Phosphorylierung voran. Darüber hinaus nimmt die Zellmembran-Expression der Todesrezeptor-Familie in vaskulären Endothelzellen zu. Aktiviert werden die Caspase 8 und die Caspase 3 durch die Abnahme von anti-apoptotischen Faktoren wie c-Flip, was am Ende den Tod der vaskulären Endothelzellen beschleunigt und somit die pathologisch vermehrte Gefäßpermeabilität noch verstärkt (59).

Die Zunahme der Flüssigkeitsmenge im Auge während der Sepsis ist auf die Infiltration durch Leukozyten und deren Sekrete und die Rückhaltung der Flüssigkeit durch entzündliche Kolloide, vor allem in ödematösen Zellen, sowie auf die Störung des Abflusses zurückzuführen. Der Überschuss an Kolloid, der sich im Kammerwasser bei Glaukomerkrankten befindet, zeigt, dass das Ziliarepithel geschädigt ist und das Entzündungsexsudat in die Augenkammer dringt, was als eine weitere Ursache für den erhöhten Augeninnendruck angesehen werden kann (60).

5.3 Einfluss von Liraglutid auf das vaskuläre Endothel

Gut dokumentiert ist die Rolle von Glukagon-Like-Peptid-1 (GLP-1) bei der Steuerung des Blutzuckerspiegels durch die glukoseabhängige Insulinausschüttung und somit das Aufrechterhalten der Glukosehomöostase im Plasma [15].

Die Bedeutung des Inkretinensystems für die Glukosehomöostase wird durch die kürzlich erfolgte erfolgreiche therapeutische Nutzung dieses Systems unter Verwendung von GLP-1-Rezeptor Agonisten (GLP-1R) und Inhibitoren des Enzyms Dipetidylpeptidase 4 (DPP-IV) unterstrichen, um die extrem kurze Halbwertszeit des nativen GLP-1 zu überwinden [184]. Die Identifizierung des GLP-1R in Geweben außerhalb der pankreatischen β -Zelle und insbesondere an vaskulären Endothelzellen deutet auf eine bisher unbekannte Rolle von GLP-1 in der Gefäßbiologie hin [98].

In vitro natives GLP-1 dämpft die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte PAI-1- (Plasminogen Activator Inhibitor Type 1-Expression) und VAM-Expression (Vascular Adhesion Molecule) in menschlichen vaskulären Endothelzellen [185]. In vivo-Studien zeigten, dass natives GLP-1 den vaskulären Tonus und die endotheliale Funktion reguliert [16,17]. Klinische Studien berichteten von einer reduzierten endothelialen Dysfunktion bei Typ-2-Diabetikern mit etablierter koronarer Herzkrankheit [98]. Liraglutid ist ein acyliertes GLP-1-Analogon und hat eine Halbwertszeit von 10-14 Stunden, was eine einmal tägliche subkutane (s.c.) Injektion ermöglicht. Klinische Studien mit Liraglutid bei Patienten mit Typ-2-Diabetes zeigten einen verbesserten nüchternen und postprandialen Glukosespiegel mit einer Verbesserung der β -Zellfunktion, eine Verringerung der Glukagonkonzentration im Plasma, Gewichtsverlust, einen reduzierten Blutdruck und eine Verbesserung der Biomarker für kardiovaskuläre Risiken [18,186]. Frühere Studien haben die Wirksamkeit von GLP-1 und seinem analogen Liraglutid bei der Hemmung von Zytokin und leichter Hyperglykämie induzierter Expression von Gefäßpeptiden nachgewiesen [185].

Neuere Evidenz deutet darauf hin, dass Inkretin-basierte Therapien, zusätzlich zur Verbesserung der Glykämiekontrolle, einen Schutz vor Atherosklerose beim Typ-2-Diabetes durch die Verbesserung der vaskulären Endotheldysfunktion ermöglichen können [98].

Daher vermuteten wir, dass Liraglutid dieselben positiven Effekte auf die endotheliale Funktion der Arteria Ophthalmica haben könnte und wollten diese Hypothese testen. Weiterhin übt Liraglutid eine entzündungshemmende Wirkung auf vaskuläre Endothelzellen aus, indem es die Stickoxidproduktion erhöht und die Aktivierung von Nuclear factor κ B (NF- κ B) unterdrückt, teilweise zumindest durch AMP-Activated Protein Kinase-Aktivierung (AMPK). Diese Effekte können einige der beobachteten vasoprotektiven Eigenschaften von Liraglutid sowie seine positiven Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System erklären [187]. Eine deutliche Besserung der gestörten Endothelfunktion konnten wir auch nachweisen, indem eine verbesserte durchschnittliche Reaktion der untersuchten Aa. Ophthalmicae in der mit Liraglutid-behandelten Gruppe auf Acetylcholin im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigt wurde. Somit können wir davon ausgehen, dass die endotheliale Dysfunktion, die in unserer Studie durch Sepsis verursacht wurde, durch Liraglutid sehr deutlich verbessert worden ist. Auf der anderen Seite war die Reaktion auf endothelunabhängiges Phenylephrin und Natriumnitroprussiat (SNP) bei dieser Gruppe ähnlich zu den anderen untersuchten Gruppen, was unsere Vermutung noch verstärkt.

In einer Studie von Ivanov und Alexey wurde festgestellt, dass die Verabreichung von Liraglutid zur Normalisierung des Kohlenhydratstoffwechsels und gleichzeitig zur Korrektur der Mikrozirkulation bei Ratten mit absolutem Insulinmangel führt, wodurch sich eine Normalisierung der Hautdurchblutung der hinteren Pfotenhaut der Versuchstiere zeigte. [188].

Die Wiederherstellung der Mikrozirkulation ist mit einer Abnahme der Gefäßkonstriktion und einer Stimulierung der endothelabhängigen Vasodilatation verbunden, die durch eine gleichzeitige Abnahme der Konzentrationen von Katecholaminen, Endothelin-1 und asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) im Blutserum verursacht wird. Gleichzeitig führt die Verabreichung von Liraglutid zu einer Verringerung der Konzentration von Alterationsmarkern der Endothelzellen im Blut, wie sE-Selektin (Endothelselektin), Syndecan-1 und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: Vascular endothelial growth factor = VEGF). Diese Eigenschaft von Liraglutid eröffnet neue Perspektiven für seine Zulassung als potenzielles Medikament zur pathogenetischen Korrektur von Mikrozirkulationsstörungen bei Patienten mit DM Typ 1. [188].

In den Studien LEADER [133] und SUSTAIN-6 [134] wurde behauptet, dass der Mechanismus hinter der verbesserten Verringerung des kardiovaskulären Risikos auf die entzündungshemmenden Eigenschaften von Liraglutid und Semaglutid zurückzuführen ist, Diese bewirken eine verringerte Expression des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls und eine Hemmung der Aktivierung des Nuklearfaktors κ B in der Aorta und den Endothelzellen. [19,22,185,189].

Diese Vermutung, dass Liraglutid entzündungshemmende Eigenschaften hat, wird durch Langzeitstudien an ApoE^{-/-} und Ldlr^{-/-} Mäusen gestützt, die zeigen, dass Liraglutid und Semaglutid die Expression von Entzündungsgenen regulieren. [190].

In einer anderen Studie wurde ein ähnliches Tiermodell verwendet und die Auswirkungen von GLP-1-Analoga auf das Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte disseminierte intravasale Gerinnung (engl. Disseminiert intravasal coagulation, DIC) und mikrovaskuläre Thrombose weiter untersucht. Thrombozytopenie, mikrovaskuläre Thrombose im Lungenkreislauf, endotheliale Dysfunktion und erhöhte Entzündungsmarker in der Aorta und im Blut wurden durch das GLP-1-Analogon bei LPS-induzierter Sepsis verbessert. Durch die Verwendung von GLP-1R-Knockout-Tieren konnte nachgewiesen werden, dass die günstigen Auswirkungen von Liraglutid auf die Mortalität und DIC über den GLP-1-Rezeptor vermittelt werden [191].

Der Mechanismus besteht darin, dass das GLP-1-Analogon die Entzündung und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Gefäßsystem hemmt, was zu einer verbesserten endothelabhängigen Vasorelaxation und einer Normalisierung der Hypotonie führt [192].

In einer Studie auf ein ähnliches Tiermodell verglichen mit unerem Tiermodell zeigte sich eine starke immunmodulatorische Wirkung nach Aktivierung der GLP-1Rezeptoren durch Liraglutid, die zu einer Verbesserung der vaskulären Dysfunktion und einer Verringerung von oxidativem Stress und Entzündungen fuhr [193].

5.4 Einflussfaktoren auf den oxidativen Stress in der Immunhistochemischen Färbung

Dihydroethidium (DHE) ist ein validierter Indikator für den Nachweis von Superoxid (O₂⁻), welches für die Lokalisierung von Superoxid in gefrorenen Abschnitten von Aortensegmenten und Myokard entwickelt wurde [194,195]. Die Dihydroethidium-Färbung (DHE-Färbung) wurde verwendet, um den in situ Superoxidspiegel (O₂⁻) im Myokard zu bestimmen und

dadurch den oxidativen Stress in den untersuchten Zellen zu bestimmen [196]. DHE ist für Zellen frei durchlässig und wird in Gegenwart von Superoxid zu fluoreszierendem Ethidiumbromid oxidiert, das intrazellulär durch Einlagerung in die DNA eingeschlossen wird. Superoxid (O_2^-) ist eines der wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ein Redoxprodukt von molekularem Sauerstoff. Es beteiligt sich an Signalwegen und wird als ein etablierter Marker für oxidativen Stress angewandt [197,198]. Zudem führt Superoxid (O_2^-) zur Bildung anderer ROS, einschließlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und eines Hydroxylrestes ($-OH$) mit reaktiven Stickstoffspezies (RNS) [199,200]. Die genaue Bestimmung ist entscheidend für das Verstehen zahlreicher physiologischer Phänomene und Pathologien wie Zellproliferation, Apoptose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Krebs [201,202].

In den frühen wissenschaftlichen Betrachtungen wurden mehrere Methoden zum Nachweis von O_2^- beschrieben. Diese Methoden beinhalten Lucigenin- und Luminol-Assays, Elektronenparamagnetische Resonanz, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Verbindung mit Massenspektrometrie (MS) und Fluoreszenz. Die meisten dieser Methoden sind nicht spezifisch für den O_2^- -Nachweis [199]. Die signifikante Beteiligung von Superoxid am oxidativen Stress des diabetischen Myokards wurde in einer Studie bereits nach drei Monaten Diabetes beobachtet [203]. Eine Erhöhung der Superoxidproduktion in der Aorta diabetischer Ratten konnte in Endothelzellen nachgewiesen werden und ist für die Gefäßdysfunktion im Streptozotocin-induzierten Modell des Diabetes verantwortlich [194].

5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Zusammenfassend konnten wir eine positive antioxidantische inotrope Wirkung von Liraglutid auf die Endothelfunktion der Arteria ophthalmica in unserem Sepsismodell nachweisen. Dies zeigte sich in unserer Studie durch eine deutliche Verbesserung der gestörten Endothelfunktion um circa 50%, was ungefähr einer gesunden Endothelfunktion entspricht. Eine bedeutende Verringerung der Anzahl gestresster Endothelzellen bei der Liraglutid-Gruppe zeigte sich in der DHE-Färbung deutlicher als dies in der Sepsis-Gruppe, die eine erhöhte Anzahl der gestressten Zellen zeigte.

Zudem gibt es Evidenz, die darauf hindeutet, dass Inkretin-basierte Therapien neben der Verbesserung der Blutzuckerkontrolle auch einen Schutz vor Atherosklerose bei Typ-2-Diabetes durch Verbesserung der Endothelzellfunktion ermöglichen kann [98]. Der Typ-2-Diabetes ist nämlich durch die beschleunigte Atherosklerose charakterisiert. Durch die Hemmung des Plasminogen-Activator-Inhibitors und der Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen in menschlichen vaskulären Endothelzellen erhält Liraglutid seine bedeutenden Eigenschaften [185]. Außerdem konnten in vivo-Studien nachweisen, dass Liraglutid den vaskulären Tonus und die endotheliale Funktion reguliert [16]. Desweiteren wurde die Wirksamkeit von GLP-1 und seinem analogen Liraglutid bei der Hemmung von Zytokin und leichter Hyperglykämie induzierter Expression von Gefäßpeptiden geprüft und bestätigt [185]. Interessanterweise kann Liraglutid die Stickoxidkonzentration erhöhen, die Aktivierung von Nuclear factor κ B (NF- κ B) unterdrücken und somit seinen entzündungshemmenden Effekt auf die vaskulären Endothelzellen ausüben. Dieses kann auch seine vasoprotektive Auswirkung auf das Herz-Kreislauf-System erklären [187]. Daraus entstammt die Idee unserer Studie, dass Liraglutid, durch die Erhöhung der Stickoxidkonzentration sowie protektiven Effekten vor oxidativem Stress, der die endotheliale Dysfunktion der Arteria Ophthalmica verbessern kann, sodass vielleicht in der näheren Zukunft im Rahmen der Therapie ophthalmologischer Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der vaskulären Endothelzellen wie Glaukome einhergehen, eine neuartige Therapie möglich sein könnte.

6. Zusammenfassung

Bei vielen okulären Erkrankungen, wie dem Glaukom, der diabetischen Retinopathie bzw. im Rahmen septischen Geschehens ist eine Dysfunktion des Gefäßendothels aufzufinden. Die Dysfunktion wird oft durch oxidativen Stress hervorgerufen. Ziel der Studie war es, die Hypothese zu testen, dass Liraglutid, ein Glukagon-Like-Peptid-1-Analogon, die Endothelfunktion okulärer Blutgefäße verbessert und oxidativen Stress reduziert. Für unsere Versuche haben wir ein Sepsis-Modell der Maus verwendet.

In der Arbeit wurden drei Gruppen von Mäusen untersucht, eine Wildtyp-Gruppe (Kontrollgruppe), eine Sepsis-Gruppe und eine mit Liraglutid-behandelte Sepsis-Gruppe. Die Sepsis wurde durch Ligatur und Punktion des Blinddarms hervorgerufen. Liraglutid wurde intraperitoneal verabreicht. Nach Tötung der Mäuse führten wir *in vitro* pharmakologische Studien an Segmenten der Arteria ophthalmica durch. Außerdem wurde an Gefrierschnitten der Arteria ophthalmica die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen mittels Dihydroethidium bestimmt.

Wir konnten zeigen, dass die endothelabhängige Vasodilatation und die Konzentration reaktiver Sauerstoffverbindungen in der Arteria ophthalmica in der Sepsis-Gruppe im Vergleich zur Liraglutid-Sepsis-Gruppe verringert waren. Die Ergebnisse zeigen erstmals an einem okulären Gefäßmodell, dass Liraglutid die Endothelfunktion verbessert. Dies könnte die Anwendungsmöglichkeiten von Liraglutid in der Behandlung von Erkrankungen mit vaskulärer Endotheldysfunktion möglicherweise auch am Auge erweitern.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.1: Anatomie des menschlichen Auges

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11534/figure/A11/?report=objectonly>) (16.04.2019 20:24 Uhr).

Abbildung 2.1.2: Struktur der Netzhaut

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10885/figure/A740/?report=objectonly>

Abbildung 2.2.1: Blutversorgung des Augapfels: Verlauf der Arteria Ophthalmica

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray514.png#/media/File:Gray514.png> (16.04.2019 20:30)

Abbildung 2.2.2: Blutversorgung des Augapfels: Verlauf der Ziliararterie

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gray873.png#/media/File:Gray873.png> (16.04.2019 20:29).

Abbildung 2.3.1: Endothelzellen als Regulator der glatten Muskelzellen

<https://academic.oup.com/view-large/figure/51289309/ef0110417002.jpeg>

Abbildung 3.3.1: Präparation der Orbitastrukturen (Foto erfasst von T. Arad).

Abbildung 3.3.2: Entfernen benachbarter Gewebe der A. Ophthalmica (Foto erfasst von T. Arad).

Abbildung 3.3.3: Duales Kreislauf-Nährsystem (Grafik erstellt von T. Arad).

Abbildung 3.4.1: Vorbereitung der Kryoschnitte für die DHE-Färbung (Foto erfasst von W. Omran 16.07.2018 11:35 Uhr).

Abbildung 3.4.2: Bewahrung der Kryoschnitte mit DHE im Inkubationsschrank unter 37° für 30 Minuten (Foto erfasst von W. Omran 15.07.2018 17:35 Uhr).

Grafik 4.1.1.1: Dosiswirkungskurven des vaskulären Endothels der murinen Arteria Ophthalmica auf Phenylephrin in aller untersuchter Gruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe).

Grafik 4.1.2.1: Die Reaktionskurven des vaskulären Endothels auf den endothel-unabhängigen Vasodilatator SNP aller untersuchter Gruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe).

Grafik 4.1.3.1: Reaktionskurven des vaskulären Endothels nach Gabe des endothelabhängigen Vasodilatators Acetylcholin aller untersuchter Gruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe).

Abbildung 4.2.1: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische DHE-Färbungen zur Darstellung von oxidativem Stress an der murinen Arteria Ophthalmica in allen Untersuchungsgruppen.

Grafik 4.2.2: Darstellung der normierten DHE-Färbungsintensität für die drei Untersuchungsgruppen (Sham, Sepsis, Sepsis unter Liraglutidgabe).

8. Danksagung

An erster Stelle, und mögen mir andere verzeihen, möchte ich mich bei meinem Doktorvater herzlich bedanken. Zu jeder Uhrzeit war er für mich da, hat mich unterstützt und mir immer geholfen, auch wenn es mal eine schwere Phase gegeben hat. Herzlichen Dank.

Besonderer Dank gilt auch,, für die Möglichkeit und Erlaubnis diese Arbeit im Labor der Augenklinik durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei dem gesamten Team der bedanken, mit einem ganz besonderen herzlichen Dank, und all jenen, die mir bei den Versuchen zur Seite standen. Sie waren mir stets Quell der Inspiration, haben mir geistige Anregungen gegeben, von denen andere nur träumen können. Besonders wertvoll war für mich auch das wunderbare kollegiale Arbeitsklima im Labor der Augenklinik, die sich jeder nur wünschen kann, mit allen Mitarbeitern der experimentellen Ophthalmologie zusammen zu arbeiten, bei denen ich mich auch ganz herzlich bedanken möchte.

Das gilt natürlich auch für meine Eltern,, meinen Onkel und meine Tante,, ohne die es mit dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre, weder anzufangen noch zu fertigen. Wenn ich mit dem Kopf nicht zuhause, sondern bei der Arbeit war, sind sie es gewesen, die mich wachgerüttelt haben – und mich dabei immer unterstützt und motiviert haben. Dieser Beistand ist für mich nicht gottgegeben, sondern den habe ich nur euch und eurer unendlichen Geduld zu verdanken. Euere Hilfe bedeutet mir mehr, als sich irgendjemand überhaupt vorstellen kann. Das war schon immer so und beschränkt sich nicht nur auf die Dissertation. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, besonders den Familien und, Freunden und Bekannten, die mein Jammern und Klagen jahrelang ertragen und mich immer wieder aufgerichtet haben. Ihr könnt euch nicht vorstellen, wie wichtig dieser Rückhalt für mich war.

9. Lebenslauf

Wael Omran

Adresse:

Handy:

E-mail:



STUDIUM UND WEITERBILDUNG:

2008-2014 Studium der Humanmedizin an der Tishreen-Universität, Lattakia, Syrien

2015 Approbation Doktor der Humanmedizin mit dem Prädikat gut.

BERUFSERFAHRUNG:

2015 . 6 Monate Assistenzarzt in der Pneumologie-Abteilung im städtischen Klinikum in Tartous, Syrien nach der Verleihung der syrischen Approbation

2016 . Deutsch-Intensivkurs in der Sprachschule Evolanguage in Mainz

2017 . Berufserlaubnis nach bestandener Fachsprachkenntnisprüfung bei der Bezirksärztekammer Rheinhessen in Mainz

. Ein Jahr Praktikum in der endokrinologischen Praxis Dr. Wael Omran im MED Facharztzentrum Mainz

2018 . Experimentelle Doktorarbeit (Ophthalmo-Pharmakologie und Physiologie, Uniklinik in Mainz)

. Deutsche Approbation nach bestandener Kenntnisprüfung bei der Bezirksärztekammer Rheinhessen in Mainz

. Postervortrag beim DOG-Kongress in World Conference Center, Bonn 2018

- . Praktikum im DRK-Krankenhaus in Alzey in der Inneren Medizin-Abteilung
im Rahmen der Vorbereitung auf die Kenntnisprüfung (Approbationsprüfung)
- 2019** . 6 Monate Assistenzarzt in der Ophthalmologie-Abteilung des SLK-Klinikums
am Gesundbrunnen in Heilbronn
- 2019-2022** . Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der
Universitätsmedizin Greifswald bis 30.06.2022.
- 2022** . Vortragspreis in der Glaukomsitzung bei der 29 Jahrestagung der Sachsen-
Anhaltlich-Thüringischen Augenärztegesellschaft Sath
- 2022- jetzt** . Aktuell Assistenzarzt im letzten Facharztausbildungsjahr in der
Universitätsaugenklinik der medizinischen Fakultät der Otto von Guericke
Universität in Magdeburg seit 01.07.22.

Literatur

1. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2006;291:H985-H1002.
2. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-27-III-32.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *nature* 1980;288:373–376.
4. Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986;8:II61.
5. Winquist RJ, Bunting PB, Baskin EP, Wallace AA. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. *Journal of hypertension* 1984;2:541–545.
6. Ibengwe JK, Suzuki H. Changes in mechanical responses of vascular smooth muscles to acetylcholine, noradrenaline and high-potassium solution in hypercholesterolemic rabbits. *British journal of pharmacology* 1986;87:395.
7. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, van Hove CE, Coene M-C, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. I. Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits. *Circulation research* 1986;58:552–564.
8. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *New England Journal of Medicine* 1986;315:1046–1051.
9. Jayakody L, Kappagoda T, Senaratne MP, Thomson AB. Impairment of endothelium-dependent relaxation: an early marker for atherosclerosis in the rabbit. *British journal of pharmacology* 1988;94:335.
10. Group, Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study. Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. *American journal of ophthalmology* 1998;126:487–497.
11. Flammer J. The vascular concept of glaucoma. *Survey of ophthalmology* 1994;38:S3-S6.
12. Hayreh SS. Factors influencing blood flow in the optic nerve head. *Journal of glaucoma* 1997;6:412–425.
13. Michelson G, Langhans MJ, Harazny J, Dichtl A. Visual field defect and perfusion of the juxtapapillary retina and the neuroretinal rim area in primary open-angle glaucoma. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 1998;236:80–85.
14. Yamazaki Y, OC SMD. The relationship between progression of visual field defects and retrobulbar circulation in patients with glaucoma. *American journal of ophthalmology* 1997;124:287–295.
15. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological reviews* 2008;60:470–512.
16. Golpon HA, Puechner A, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36) amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regulatory peptides* 2001;102:81–86.

17. Yu M, Moreno C, Hoagland KM, Dahly A, Ditter K, Mistry M, et al. Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats. *Journal of hypertension* 2003;21:1125–1135.
18. Elbrønd B, Jakobsen G, Larsen S, Agersø H, Jensen LB, Rolan P, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. *Diabetes care* 2002;25:1398–1404.
19. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* 2012;221:375–382.
20. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Hölscher C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2011;31:6587–6594.
21. Parthasarathy V. Effects of GLP-1 analogue, liraglutide on inflammation, stem cell proliferation, differentiation and cognition in mouse brain; 2013.
22. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, Hu Y, Widdop RE, Knudsen LB, et al. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE^{-/-}-mouse model. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2011;8:117–124.
23. Kolb H. Gross anatomy of the eye. In: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. University of Utah Health Sciences Center; 2007.
24. Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Katz L, LaMantia A, McNamara J, et al. *Neuroscience* 2nd edition. Sunderland (ma) sinauer associates. Inc; 2001.
25. Kiel JW. Chapter 2, anatomy. The ocular circulation. San Rafael (Ca): Morgan & Claypool Life sciences 2010.
26. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999;340:115–126.
27. Haller H. Endothelial function. *Drugs* 1997;53:1–10.
28. Meyer GRY de, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Progress in cardiovascular diseases* 1997;39:325–342.
29. Mombouli J, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995;35:679–705.
30. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocrine reviews* 2001;22:36–52.
31. Furchgott RF. Introduction to EDRF research. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993;22:S1-2.
32. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Progress in cardiovascular diseases* 1995;38:105–128.
33. Cooke, MD, John P, Dzau, MD, Victor J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annual review of medicine* 1997;48:489–509.
34. Vasomotor tone and the role of nitric oxide, Vol 3; 1998.
35. Marín J, Sánchez-Ferrer CF. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *General Pharmacology: The Vascular System* 1990;21:575–587.

36. Wennmalm A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *Journal of internal medicine* 1994;235:317–327.
37. Lopez-Jaramillo P, Gonzalez MC, Palmer RM, Moncada S. The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *British journal of pharmacology* 1990;101:489.
38. Griendling KK, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *The FASEB journal* 1996;10:283–292.
39. Watts GF, O'Brien SF, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clinical Science* 1996;91:567–573.
40. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *The Journal of clinical investigation* 1992;90:2548–2554.
41. Chowienzyk PJ, Watts GF, Wierzbicki AS, Cockcroft JR, Brett SE, Ritter JM. Preserved endothelial function in patients with severe hypertriglyceridemia and low functional lipoprotein lipase activity. *Journal of the American College of Cardiology* 1997;29:964–968.
42. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 1996;97:22–28.
43. Huvers FC, Leeuw PW de, Houben AJ, Haan CH de, Hamulyak K, Schouten H, et al. Endothelium-dependent vasodilatation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes* 1999;48:1300–1307.
44. Mäkimattila S, Mäntyselkä M, Groop P-H, Summanen P, Virkamaäki A, Schlenzka A, et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1997;95:618–625.
45. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *The Journal of clinical investigation* 1994;94:2511–2515.
46. van Lieburg AF, Knoers NV, Monnens LAH, Smits P. Effects of arginine vasopressin and 1-desamino-8-D arginine vasopressin on forearm vasculature of healthy subjects and patients with a V2 receptor defect 1995.
47. Cacoub P, Carayon A, Dorent R, Nataf P, Chemlal K, Maistre G, et al. L'endothéline: vasoconstricteur des années 1990? *La Revue de médecine interne* 1993;14:229–232.
48. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Investigative ophthalmology & visual science* 1992;33:2340–2343.
49. Levin ER. Endothelins as cardiovascular peptides. *American journal of nephrology* 1996;16:246–251.
50. Goldin E, Casadevall M, Mourelle M, Cirera I, Elizalde JI, Panes J, et al. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastrointestinal hyperemia of diabetic rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996;270:G684-G690.

51. Viberti GC, Boggetti E, Wiseman MJ, Benigni A, Remuzzi G. Glomerular hyperfiltration and urinary prostaglandins in type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine* 1989;6:219–223.
52. Hsueh WA, Anderson PW. Systemic hypertension and the renin-angiotensin system in diabetic vascular complications. *The American journal of cardiology* 1993;72:H14-H21.
53. McFarlane R, McCredie RJ, Bonney M-A, Molyneaux L, Zilkens R, Celermajer DS, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition and arterial endothelial function in adults with type 1 diabetes mellitus. *Diabetic medicine* 1999;16:62–66.
54. Rabelink T, Bakris G. The renin-angiotensin system in diabetic nephropathy: the endothelial connection. *Mineral and electrolyte metabolism* 1998;24:381–388.
55. Studdy PR, Lapworth R, Bird R. Angiotensin-converting enzyme and its clinical significance--a review. *Journal of clinical pathology* 1983;36:938–947.
56. Lerman A, Burnett Jr JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 1992;86:III12.
57. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 1999;34:631–638.
58. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC. Multiple system organ failure: the role of uncontrolled infection. *Archives of Surgery* 1980;115:136–140.
59. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s: systemic inflammatory response and organ dysfunction. *Jama* 1994;271:226–233.
60. Backer D de, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;166:98–104.
61. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, et al. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997;273:H286-H294.
62. Bannerman DD, Fitzpatrick MJ, Anderson DY, Bhattacharjee AK, Novitsky TJ, Hasday JD, et al. Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction. *Infection and immunity* 1998;66:1400–1407.
63. Hauptmann S, Klosterhalfen B, Weis J, Mittermayer C, Kirkpatrick CJ. Skeletal muscle oedema and muscle fibre necrosis during septic shock. Observations with a porcine septic shock model. *Virchows Archiv* 1994;424:653–659.
64. Hammes H-P, Feng Y, Pfister F, Brownlee M. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes* 2011;60:9–16.
65. Pastor JC, La Rúa ER de, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Progress in Retinal and Eye Research* 2002;21:127–144.
66. Zheng B, Li T, Chen H, Xu X, Zheng Z. Correlation between ficolin-3 and vascular endothelial growth factor-to-pigment epithelium-derived factor ratio in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology* 2011;152:1039–1043.
67. Aveleira CA, Lin C-M, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA. TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes* 2010;59:2872–2882.

68. Saker S, Stewart EA, Browning AC, Allen CL, Amoaku WM. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Experimental eye research* 2014;121:161–167.
69. Leal EC, Aveleira CA, Castilho AF, Serra AM, Baptista FI, Hosoya K-I, et al. High glucose and oxidative/nitrosative stress conditions induce apoptosis in retinal endothelial cells by a caspase-independent pathway. *Experimental eye research* 2009;88:983–991.
70. Balakumar P, Chakkarwar VA, Krishan P, Singh M. Vascular endothelial dysfunction: a tug of war in diabetic nephropathy? *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2009;63:171–179.
71. Silva RM, Abreu F de, JR, Cunha-Vaz JG. Blood-retina barrier in acute retinal branch vein occlusion. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 1995;233:721–726.
72. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New England Journal of Medicine* 1994;331:1480–1487.
73. Cook C, Foster P. Epidemiology of glaucoma: what's new? *Canadian Journal of Ophthalmology* 2012;47:223–226.
74. Casson RJ, Chidlow G, Wood JPM, Crowston JG, Goldberg I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clinical & experimental ophthalmology* 2012;40:341–349.
75. Resch H, Garhofer G, Fuchsjäger-Mayrl G, Hommer A, Schmetterer L. Endothelial dysfunction in glaucoma. *Acta ophthalmologica* 2009;87:4–12.
76. Becquet F, Courtois Y, Goureau O. Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Survey of ophthalmology* 1997;42:71–82.
77. Behar-Cohen FF, Goureau O, D'Hermies F, Courtois Y. Decreased intraocular pressure induced by nitric oxide donors is correlated to nitrite production in the rabbit eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 1996;37:1711–1715.
78. Haefliger IO, Meyer P, Flammer J, Lüscher TF. The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Survey of ophthalmology* 1994;39:123–132.
79. Mann RM, Riva CE, Stone RA, Barnes GE, Cranstoun SD. Nitric oxide and choroidal blood flow regulation. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995;36:925–930.
80. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Experimental eye research* 1995;61:33–44.
81. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *nature* 1988;333:664–666.
82. Noske W, Hensen J, Wiederholt M. Endothelin-like immunoreactivity in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and cataract. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* 1997;235:551–552.
83. Nathanson JA, McKee M. Alterations of ocular nitric oxide synthase in human glaucoma. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995;36:1774–1784.
84. Nathanson JA, McKee M. Identification of an extensive system of nitric oxide-producing cells in the ciliary muscle and outflow pathway of the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995;36:1765–1773.

85. Haefliger IO, Dettmann E, Liu R, Meyer P, Prünke C, Messerli J, et al. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Survey of ophthalmology* 1999;43:S51-S58.
86. Lee Y-S, Jun H-S. Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells. *Metabolism* 2014;63:9–19.
87. Garber A, Henry RR, Ratner R, Hale P, Chang CT, Bode B. Liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, provides sustained improvements in glycaemic control and weight for 2 years as monotherapy compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, obesity and metabolism* 2011;13:348–356.
88. Karaca M, Magnan C, Kargar C. Functional pancreatic beta-cell mass: involvement in type 2 diabetes and therapeutic intervention. *Diabetes & metabolism* 2009;35:77–84.
89. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* 2006;368:1696–1705.
90. Garber AJ. Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability. *Diabetes care* 2011;34:S279-S284.
91. Tremblay AJ, Lamarche B, Deacon CF, Weisnagel SJ, Couture P. Effects of sitagliptin therapy on markers of low-grade inflammation and cell adhesion molecules in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2014;63:1141–1148.
92. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiyama T, et al. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* 2010;59:1030–1037.
93. Perry T, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002;302:881–888.
94. Chien C-T, Jou M-J, Cheng T-Y, Yang C-H, Yu T-Y, Li P-C. Exendin-4-loaded PLGA microspheres relieve cerebral ischemia/reperfusion injury and neurologic deficits through long-lasting bioactivity-mediated phosphorylated Akt/eNOS signaling in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2015;35:1790–1803.
95. McClean PL, Gault VA, Harriott P, Hölscher C. Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: a link between diabetes and Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology* 2010;630:158–162.
96. Han W-N, Hölscher C, Yuan L, Yang W, Wang X-H, Wu M-N, et al. Liraglutide protects against amyloid- β protein-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Neurobiology of aging* 2013;34:576–588.
97. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis* 2012;221:375–382.
98. Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, Zhang F, Holst JJ, Ahrén B, et al. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2004;287:E1209-E1215.
99. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated

- vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;39:257–265.
100. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology* 1995;26:1235–1241.
 101. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity research* 2003;11:1278–1289.
 102. Hoffman BB. Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* 1996:105–140.
 103. Friederich JA, Butterworth JF. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. *Anesthesia & Analgesia* 1995;81:152–162.
 104. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *The Journal of clinical investigation* 1986;78:1–5.
 105. Caulfield MP. Muscarinic receptors—characterization, coupling and function. *Pharmacology & therapeutics* 1993;58:319–379.
 106. Wess J, Buhl T, Lambrecht G, Mutschler E. Cholinergic Receptors in *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 3; Emmett, JC, Ed. Pergamon Press: Oxford, UK; 1990.
 107. Caulfield MP, Birdsall NJM. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological reviews* 1998;50:279–290.
 108. Faraci FM, Sigmund CD. Vascular biology in genetically altered mice: smaller vessels, bigger insight. *Circulation research* 1999;85:1214–1225.
 109. Lamping KG, Wess J, Cui Y, Nuno DW, Faraci FM. Muscarinic (M) receptors in coronary circulation: gene-targeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;24:1253–1258.
 110. Li X, Wu W, Wang Y, Zhang X, Feng X, Liu R. GLP-1 agonists Liraglutide improved vascular endothelial function in type 2 diabetes rats. *Diabetes Research: Open Access* 2020;2:46.
 111. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *The American journal of medicine* 1998;105:32S-39S.
 112. Seifalian AM, Filippatos TD, Joshi J, Mikhailidis DP. Obesity and arterial compliance alterations. *Current vascular pharmacology* 2010;8:155–168.
 113. Schmetterer L, Polak K. Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001;20:823–847.
 114. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993;22:S1-14.
 115. Siasos G, Tousoulis D, Vlachopoulos C, Antoniadis C, Stefanadi E, Ioakeimidis N, et al. Short-term treatment with L-arginine prevents the smoking-induced impairment of endothelial function and vascular elastic properties in young individuals. *International journal of cardiology* 2008;126:394–399.
 116. Tousoulis D, Tsarpalis K, Cokkinos D, Stefanadis C. Effects of insulin resistance on endothelial function: possible mechanisms and clinical implications. *Diabetes, obesity and metabolism* 2008;10:834–842.

117. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546–549.
118. Kakar P, Lip GYH. Hypertension: endothelial dysfunction, the prothrombotic state and antithrombotic therapy. *Expert review of cardiovascular therapy* 2007;5:441–450.
119. Siasos G, Paraskevopoulos T, Gialafos E, Rapti A, Oikonomou E, Zaromitidou M, et al. Vascular function and ocular involvement in sarcoidosis. *Microvascular Research* 2015;100:54–58.
120. Bourouki E, Oikonomou E, Moschos M, Siasos G, Siasou G, Gouliopoulos N, et al. Pseudoexfoliative glaucoma, endothelial dysfunction, and arterial stiffness: The role of circulating apoptotic endothelial microparticles. *Journal of glaucoma* 2019;28:749–755.
121. Siasos G, Tousoulis D, Siasou G, Moschos MM, Oikonomou E, Zaromitidou M, et al. The association between glaucoma, vascular function and inflammatory process. *International journal of cardiology* 2011;146:113–115.
122. Gouliopoulos N, Antonopoulos AS, Siasos G, Moschos MM, Oikonomou E, Kassi E, et al. Macrovascular function indices for the prediction of diabetic retinopathy development in patients with type 2 diabetes. *European journal of preventive cardiology* 2017;24:1405–1407.
123. Christoffersen NLB, Larsen M. Pathophysiology and hemodynamics of branch retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 1999;106:2054–2062.
124. McAllister IL. Central retinal vein occlusion: a review. *Clinical & experimental ophthalmology* 2012;40:48–58.
125. Yamamoto T, Kitazawa Y. Vascular pathogenesis of normal-tension glaucoma: a possible pathogenetic factor, other than intraocular pressure, of glaucomatous optic neuropathy. *Progress in Retinal and Eye Research* 1998;17:127–143.
126. Wiciński M, Socha M, Malinowski B, Wódkiewicz E, Walczak M, Górski K, et al. Liraglutide and its Neuroprotective properties—focus on possible biochemical mechanisms in Alzheimer’s disease and cerebral ischemic events. *International journal of molecular sciences* 2019;20:1050.
127. Alvarez E, Martínez MD, Roncero I, Chowen JA, García-Cuartero B, Gisbert JD, et al. The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *Journal of neurochemistry* 2005;92:798–806.
128. Bullock BP, Heller RS, Habener JF. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 1996;137:2968–2978.
129. Campos RV, Lee YC, Drucker DJ. Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 1994;134:2156–2164.
130. Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS letters* 1995;358:219–224.
131. Wei Y, Mojsov S. Distribution of GLP-1 and PACAP receptors in human tissues. *Acta physiologica scandinavica* 1996;157:355–357.
132. Schmidtler J, Dehne K, Allescher H-D, Schusdziarra V, Classen M, Holst JJ, et al. Rat parietal cell receptors for GLP-1-(7-36) amide: northern blot, cross-linking, and

- radioligand binding. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1994;267:G423-G432.
133. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JFE, Nauck MA, et al. Liraglutide and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine* 2016;375:311–322.
 134. Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jódar E, Leiter LA, et al. Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2016;375:1834–1844.
 135. Davies MJ, D’Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care* 2018;41:2669–2701.
 136. Ravassa S, Zudaire A, Díez J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovascular research* 2012;94:316–323.
 137. Woo JS, Kim W, Ha SJ, Kim JB, Kim S-J, Kim W-S, et al. Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment–elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2013;33:2252–2260.
 138. Basalay MV, Mastitskaya S, Mrochek A, Ackland GL, Del Arroyo AG, Sanchez J, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning. *Cardiovascular research* 2016;112:669–676.
 139. Koska J, Sands M, Burciu C, D’Souza KM, Raravikar K, Liu J, et al. Exenatide protects against glucose-and lipid-induced endothelial dysfunction: evidence for direct vasodilation effect of GLP-1 receptor agonists in humans. *Diabetes* 2015;64:2624–2635.
 140. Torekov SS. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and cardiovascular disease: from LEADER to EXSCEL. *Cardiovascular research* 2018;114:e70-e71.
 141. Zhai R, Xu H, Hu F, Wu J, Kong X, Sun X. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist regulates retinal capillary tone and restores microvascular patency after ischaemia–reperfusion injury. *British journal of pharmacology* 2020;177:3389–3402.
 142. Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefler J, Bolz S-S, Drucker DJ, Husain M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor–dependent and–independent pathways. *Circulation* 2008;117:2340–2350.
 143. Dai Y, Mehta JL, Chen M. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelin-1 in endothelial cell by repressing nuclear factor-kappa B activation. *Cardiovascular drugs and therapy* 2013;27:371–380.
 144. Gimbrone Jr MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, GARCIA• CARDEÑ•A G. Endothelial Dysfunction, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis a. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;902:230–240.
 145. Tomasian D, Keaney Jr JF, Vita JA. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovascular research* 2000;47:426–435.
 146. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary

- risk factors and their interaction. *Journal of the American College of Cardiology* 1994;24:1468–1474.
147. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes Jr DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948–954.
 148. Vogel RA, Corretti MC. Estrogens, progestins, and heart disease: can endothelial function divine the benefit? *Am Heart Assoc*; 1998.
 149. Wei C-M, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:1580–1586.
 150. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *nature* 1988;332:411–415.
 151. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive care medicine* 2000;26:305–313. <https://doi.org/10.1007/s001340051154>.
 152. Hensen A, Modin A, Weitzberg E. Increased concentrations of endothelin-1 messenger RNA in tissues and endothelin-1 peptide in plasma in septic pigs: modulation by betamethasone. *Critical care medicine* 1996;24:1530–1536.
 153. Kido T, Sawamura T, Masaki T. The processing pathway of endothelin-1 production. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1998;31:S13-S15.
 154. Schuetz P, Christ-Crain M, Zimmerli W, Mueller B. Repeated measurements of endothelin-1 precursor peptides predict the outcome in community-acquired pneumonia. *Intensive care medicine* 2011;37:970–980.
 155. SCHWEIZER A, VALDENNAIRE O, NELBÄCK P, DEUSCHLE U, DUMAS MILNE EDWARDS J-B, STUMPF JG, et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal* 1997;328:871–877.
 156. Tschaikowsky K, Sdner S, Lehnert N, Kaul M, Ritter J. Endothelin in septic patients: Effects on cardiovascular and renal function and its relationship to proinflammatory cytokines. *Critical care medicine* 2000;28:1854–1860. https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2000/06000/Endothelin_in_septic_patients_Effects_on.28.aspx.
 157. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology* 2015;4:180–183.
 158. Lichtenberg D, Pinchuk I. Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015;461:441–444.
 159. Azzi A. Oxidative stress: a dead end or a laboratory hypothesis? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;362:230–232.
 160. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology—terminology and critical thinking. *FEBS letters* 2004;558:3–6.
 161. Rubanyi GM. Superoxide anions and hyperoxia inactive endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1986;250:H815-H821.
 162. Harrison DG. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. In: *Arteriosclerosis*. Springer; 1994:87–102.

163. Somers MJ, Harrison DG. Reactive oxygen species and the control of vasomotor tone. *Current hypertension reports* 1999;1:102–108.
164. Sriskandan S, Cohen J. The pathogenesis of septic shock. *Journal of Infection* 1995;30:201–206.
165. Gutierrez-Ramos JC, Bluethmann H. Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunology today* 1997;18:329–334.
166. Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *The American journal of pathology* 1978;93:526.
167. Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Critical care medicine* 2002;30:S207-S213.
168. Pinsky MR. Sepsis: a pro-and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. *Contributions to nephrology* 2001;132:354–366.
169. Hansberg W, Groot H de, Sies H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine* 1993;14:287–293.
170. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014;15:411–421.
171. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic MM, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 2006;160:1–40.
172. Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. The bad, the good, and the ugly about oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012;2012.
173. Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental gerontology* 2001;36:1539–1550.
174. Ercan H, Birben E, Dizdar EA, Keskin O, Karaaslan C, Soyer OU, et al. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006;118:1097–1104.
175. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2017;44:532–553.
176. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007;47:89–116.
177. Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003;43:233–260.
178. Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 2002;294:1–12.
179. Reddy SP. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Current molecular medicine* 2008;8:376–383.
180. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 2014;39:199–218.

181. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circulation research* 2008;103:1232–1240.
182. Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology and Medicine* 2015;88:179–188.
183. Cao TT, Ma L, Kandpal G, Warren L, Hess JF, Seabrook GR. Increased nuclear factor- κ B erythroid 2 p45-related factor 2 activity protects SH-SY5Y cells against oxidative damage. *Journal of neurochemistry* 2005;95:406–417.
184. Drab SR. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: current status and future prospects. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2010;30:609–624.
185. Liu H, Hu Y, Simpson RW, Dear AE. Glucagon-like peptide-1 attenuates tumour necrosis factor-alpha-mediated induction of plasminogen [corrected] activator inhibitor-1 expression. *The Journal of endocrinology* 2008;196:57–65.
186. Courreges JP, Vilsbøll T, Zdravkovic M, Le-Thi T, Krarup T, Schmitz O, et al. Beneficial effects of once-daily liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, on cardiovascular risk biomarkers in patients with Type 2 diabetes. *Diabetic medicine* 2008;25:1129.
187. Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, Satoh H, Hattori S, Kasai K, et al. RETRACTED ARTICLE: A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* 2010;53:2256–2263.
188. Ivanov AN, Lagutina DD, Saveleva MS, Popyhova EB, Stepanova TV, Savkina AA, et al. Effect of liraglutide on microcirculation in rat model with absolute insulin deficiency. *Microvascular Research* 2021;138:104206.
189. Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW, Dear AE. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE^{-/-} mouse model. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2013;10:353–360.
190. Rakipovski G, Rolin B, Nøhr J, Klewe I, Frederiksen KS, Augustin R, et al. The GLP-1 analogs liraglutide and semaglutide reduce atherosclerosis in ApoE^{-/-} and LDLr^{-/-} mice by a mechanism that includes inflammatory pathways. *JACC: Basic to Translational Science* 2018;3:844–857.
191. Steven S, Jurk K, Kopp M, Kröller-Schön S, Mikhed Y, Schwierczek K, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor signalling reduces microvascular thrombosis, nitro-oxidative stress and platelet activation in endotoxaemic mice. *British journal of pharmacology* 2017;174:1620–1632.
192. Steven S, Hausding M, Kröller-Schön S, Mader M, Mikhed Y, Stamm P, et al. Gliptin and GLP-1 analog treatment improves survival and vascular inflammation/dysfunction in animals with lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Basic Research in Cardiology* 2015;110:1–14.
193. Helmstädter J, Keppeler K, Aust F, Küster L, Frenis K, Filippou K, et al. GLP-1 analog liraglutide improves vascular function in polymicrobial sepsis by reduction of oxidative stress and inflammation. *Antioxidants* 2021;10:1175.

194. Hink U, Tsilimingas N, Wendt M, Münzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Treatments in endocrinology* 2003;2:293–304.
195. Gross ER, LaDisa Jr JF, Weihrauch D, Olson LE, Kress TT, Hettrick DA, et al. Reactive oxygen species modulate coronary wall shear stress and endothelial function during hyperglycemia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003;284:H1552-H1559.
196. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2003;285:H579-H588.
197. Hernandez MS, Britto LR, Real CC, Martins DO, Lopes LR. Reactive oxygen species and the structural remodeling of the visual system after ocular enucleation. *Neuroscience* 2010;170:1249–1260.
198. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 2002.
199. Fujita M, Tsuruta R, Kasaoka S, Fujimoto K, Tanaka R, Oda Y, et al. In vivo real-time measurement of superoxide anion radical with a novel electrochemical sensor. *Free Radical Biology and Medicine* 2009;47:1039–1048.
200. Peshvariya HM, Dusing GJ, Selemidis S. Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free radical research* 2007;41:699–712.
201. Georgiou CD, Papapostolou I, Patsoukis N, Tsegenidis T, Sideris T. An ultrasensitive fluorescent assay for the in vivo quantification of superoxide radical in organisms. *Analytical Biochemistry* 2005;347:144–151.
202. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 2007;9:49–89.
203. Fiordaliso F, Bianchi R, Staszewsky L, Cuccovillo I, Doni M, Laragione T, et al. Antioxidant treatment attenuates hyperglycemia-induced cardiomyocyte death in rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2004;37:959–968.