

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian –Albrechts-Universität zu Kiel

**EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG ZUR KO-APPLIKATION
VON RECOMBINANT TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR
(rtPA) UND BEVACIZUMAB BEI NEOVASKULÄRER AMD MIT
SUBMAKULÄRER BLUTUNG**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SVENJA PULS
aus Ratzeburg

Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jost Hillenkamp
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Petra Ambrosch
Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2017
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.10.2017

gez.: Prof. Dr. Thomas Herdegen
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungen/Legende	10
1. Einleitung	12
1.1. Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	12
1.1.1 Risikofaktoren für die AMD	12
1.1.2 Pathogenese der AMD	13
1.1.3 Formen der AMD	14
1.1.3.1 Geographische Atrophie	14
1.1.3.2 Feuchte AMD	14
1.1.4 Submakuläre Blutungen (SMB)	15
1.1.5 Diagnostik	17
1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	17
1.3. Therapiemöglichkeiten der exsudativen AMD	18
1.4 Therapiemöglichkeiten bei exsudativer AMD mit akuter submakulärer Blutung	19
1.4.1 „Recombinant Tissue Plasminogen Activator“(rtPA, Actilyse®)	21
1.4.2 VEGF-Antagonist Bevacizumab (Avastin®)	22
1.5 Plasmin	23
2. Zielsetzung	24
3. Materialien und Methoden	25
3.1 Geräte	25
3.2 Chemikalien	26
3.3 sonstige Materialien	27
3.4 Berechnung des Volumens von SMB	28
3.4.1 Fundusfotografie	28

3.4.2 Infrarot-Fundusfotografie	29
3.4.3 Optische Kohärenztomografie (OCT)	29
3.4.4 Fluoreszenzangiographie	29
3.5 Probenansätze	30
3.6 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE-Gelelektrophorese)	31
3.6.1 Färbung mit Coomassie Blue	32
3.6.2 Silberfärbung	32
3.6.3 Auswertung der Gele	33
3.7 RPE-Zellkultur	33
3.8 Anti-VEGF-Effektivität von Bevacizumab	34
3.8.1 Gewinnung von Blutproben	34
3.8.2 VEGF-ELISA	35
3.8.3 Durchführung des VEGF-ELISA	36
3.8.4 Messung des VEGF-ELISA	38
3.9 Statistik	38
4. Ergebnisse	39
4.1 Volumen der SMB	39
4.2 SDS-PAGE Gelelektrophorese	39
4.2.1 rtPA und Bevacizumab	39
4.2.1.1 Färbung nach Coomassie	39
4.2.1.2 Silberfärbung	41
4.2.2 Bevacizumab und Plasmin	43
4.2.2.1 Färbung nach Coomassie	43
4.2.2.2 Silberfärbung	45
4.3 VEGF-ELISA	48
4.3.1 Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA	48
4.3.2 Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA und Plasmin in humanem Vollblut	49

5. Diskussion	51
5.1 In-vitro Modell der SMB	51
5.2 Strukturelle Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin	51
5.3 Funktionelle Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin in humanem Vollblut in einem in-vitro Modell der submakulären Blutung	53
5.4 Klinischer Ausblick	54
6. Zusammenfassung	58
Anhang	60
Literaturverzeichnis	78
Danksagung	94
Lebenslauf	95
Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	96
Erklärung	98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der subretinalen Neovaskularisation bei AMD	16
Abb. 2: Schematische Darstellung des VEGF-ELISA	36
Abb. 3: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung	40
Abb. 4: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	42
Abb. 5: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung	44
Abb. 6: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	46
Abb. 7: VEGF-Sekretion nach Zugabe von rtPA, Bevacizumab („Beva.“) oder dem Gemisch aus Bevacizumab und rtPA	49
Abb. 8: VEGF-Sekretion nach Zugabe von Bevacizumab („Beva.“), rtPA oder dem Gemisch aus Bevacizumab, rtPA und humanem Vollblut („Blut“)	50
Abb. 9: Gelelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Coomassie Färbung in der 1:10 Verdünnung	70

Abb. 10: Gelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Coomassie Färbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	71
Abb. 11: Gelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	72
Abb. 12: Gelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	73
Abb. 13: Gelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, nach Färbung nach Coomassie in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	74
Abb. 14: Gelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, nach Färbung nach Coomassie in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	75
Abb. 15: Gelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	76
Abb. 16: Gelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin, nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung	77

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte	25
Tab. 2: Verwendete Chemikalien	26
Tab. 3: Sonstige verwendete Materialien	27
Tab. 4: Zusammensetzung des Laufpuffers (pH 8,3)	32
Tab. 5: Platten, Lösungen und Puffer für Sandwich-ELISA.....	37
Tab. 6: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung	41
Tab. 7: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung	43
Tab. 8: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung	45
Tab. 9: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	47

Tab. 10: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	60
Tab. 11: Ergebnisse von rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	60
Tab. 12: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	60
Tab. 13: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	61
Tab. 14: Ergebnisse von rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	61
Tab. 15: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	61
Tab. 16: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	61
Tab. 17: Ergebnisse von rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	62
Tab. 18: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	62
Tab. 19: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	63
Tab. 20: Ergebnisse von rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	63
Tab. 21: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	63
Tab. 22: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	64
Tab. 23: Ergebnisse von Plasmin in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie ...	64
Tab. 24: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10) in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	64

Tab. 25: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin) in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	65
Tab. 26: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	65
Tab. 27: Ergebnisse von Plasmin in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	65
Tab. 28: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10) in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	65
Tab. 29: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin) in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie	66
Tab. 30: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	66
Tab. 31: Ergebnisse von Plasmin in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	66
Tab. 32: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10) in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	67
Tab. 33: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin) in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung	67
Tab. 34: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	68
Tab. 35: Ergebnisse von Plasmin in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	68
Tab. 36: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10) in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung	68

Tab. 37: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5 μ l Bevacizumab

+ 3 μ l NaCl + 2 μ l Plasmin) in der 1:100 Verdünnung nach

Silberfärbung 69

Abkürzungen/ Legende

Abb.	Abbildung
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Beva.	Bevacizumab
°C	Grad Celsius
CATT	Comparison of AMD Treatment Trials
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CNV	choroidale Neovaskularisation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Link Immunosorbent Assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
Gem.	Gemisch
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat
HRA	Heidelberg Retina Angiografie
kDa	Kilodalton
MANTA	Multicenter Anti-VEGF Trial in Austria
MARINA	Minimally Classic/Occult Trial of the Anti-Body Ranibizumab in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
OCT	optische Kohärenztomografie
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDT	photodynamische Therapie
ppV	Pars-plana-Vitrektomie
Roti.	Roti-Marker
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SDS-PAGE-Gelelektrophorese	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SMB	Submakuläre Blutung
rtPA	<i>recombinant tissue Plasminogen Activator</i>
®	Eingetragenes Warenzeichen
Tab.	Tabelle
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
Tris	Tris-(hydroxymethy-) aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPA	Urokinase
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

1.1 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine progredient verlaufende degenerative Erkrankung von Netzhaut, retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran und Aderhaut im Bereich der Makula Lutea und zählt zu den häufigsten Ursachen für eine irreversible Erblindung oder hochgradigen Verlust der zentralen Sehkraft ab dem 50. Lebensjahr in den westlichen Industrienationen (Pascolini et al. 2004, Congdon et al. 2004). In Deutschland sind circa 4,5 Millionen Menschen erkrankt (Ziemssen et al. 2006). W.F. Schrader gibt die Zahl der fortgeschrittenen AMD-Erkrankungen 2006 mit geschätzten 710 000 Patienten an. Des Weiteren schätzt er, dass sich diese Zahl in den kommenden 15 Jahren auf über 1 Million erhöhen wird. In der gleichen Zeit wird vermutlich auch die Zahl der neovaskulären Form der AMD von etwa 485 000 auf über 700 000 ansteigen. Die jährliche Zahl der Neuerkrankungen schätzt Schrader auf etwa 500 000. 4-19% der Patienten, die an einem Auge von AMD betroffen sind, erkranken im Verlauf auch an dem zweiten Auge (Macular Photocoagulation Study Group). Die betroffenen Patienten kommen in Folge der Erkrankung nur noch erschwert im Alltag zurecht und leiden unter einer starken Einschränkung ihrer Lebensqualität (Bressler et al. 1995, Brody et al. 2002, Casten et al. 2004). Hinzu kommt die meist im höheren Lebensalter bestehende Multimorbidität, sowie die subjektiv unbefriedigenden Therapieerfolge (Wahl et al. 2008). Epidemiologische Studien zeigen vor dem Hintergrund der demografischen Entwicklung einen exponentiellen Anstieg sowohl der Prävalenz als auch der Inzidenz im mittleren bis höheren Lebensalters (Holz et al. 2006).

1.1.1 Risikofaktoren für die AMD

Zu den Risikofaktoren, die zum Auftreten einer AMD führen können, zählen in erster Linie eine genetische Disposition und ein erhöhtes Lebensalter, aber auch Rauchen, Adipositas, arterielle Hypertonie, eine lebenslange hohe Sonnenexposition, eine hohe Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren und eine geringe Aufnahme von Antioxidantien und Zink (Klein et al. 2004). Ebenso stellen Geschlecht und Hautfarbe Risikofaktoren dar. Frauen haben ein höheres Risiko, ebenso wie hellhäutige Menschen (Lang, 2008). Zudem ist die verlängerte Blutungszeit durch Einnahme von Antikoagulantien ein Risikofaktor (El Baba et al. 1986).

1.1.2 Pathogenese der AMD

Die genaue Pathogenese der AMD ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird von einer multifaktoriellen Genese in Form einer Kombination aus genetischen und Umweltfaktoren ausgegangen. Bei der AMD kommt es unter anderem zu einem Ungleichgewicht zwischen Lipidanfall und Lipidabbau im RPE. Der Umfang des intrazellulären Lipidabbaus wird durch die altersbedingte Abnahme der Gesamtzahl der postmitotischen RPE-Zellen bedingt. Das RPE hat durch die enthaltenen Melanosomen die Funktion eines Lichtfilters. Des Weiteren vermittelt das RPE den Stoffaustausch zwischen der Choriokapillaris und den Photorezeptorzellen und ist am Umsatz der Außensegmente der Photorezeptoren beteiligt (S. 504, Histologie, R. Lüllmann-Rauch, Thieme Verlag). Durch die Phagozytose abgesonderter Membranstapel der Photorezeptoraußensegmente entsteht lipidreiches Material, welches durch das RPE abgebaut wird und entweder weiter verwendet wird oder durch die Bruch'sche Membran zur Choroidea transportiert wird. Bei Störungen im Gleichgewicht zwischen Lipidanfall und -abbau kommt es zur Akkumulation lipidreicher Abbauprodukte in der Bruch'schen Membran sowie von Lipofuszin in den RPE-Zellen. Die lipidhaltigen Ablagerungen in der Bruch'schen Membran stellen sich histologisch als Drusen auf der Bruch'schen Membran dar und sind häufig das erste klinische Zeichen für eine beginnende AMD. Die durch Lipidablagerungen verdickte Bruch'sche Membran behindert den Stoffaustausch zwischen Choroidea, dem RPE und den Photorezeptoren. Auch kommt es im Rahmen der AMD zu einer ursächlich noch nicht ganz aufgeklärten Desintegration der RPE Zellschicht (B. Kirchhof et al., 2000). Der durch die verdickte Bruch'sche Membran behinderte Stoffaustausch in Kombination mit der erhöhten metabolischen Belastung führen zur Gewebehypoxie. Hierdurch wird eine Expression von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) verursacht. Weiterhin wird ein großer genetischer Einfluss auf die Pathogenese der AMD diskutiert. Auf Grund von Polymorphismen auf verschiedenen Genabschnitten kann es zu einer pathologisch erhöhten systemischen Komplementaktivierung kommen, die zu einer chronischen Entzündungsreaktion führt (B. Weber et al., 2014). Diese Entzündungsreaktion scheint in der Pathogenese der AMD eine Rolle zu spielen.

1.1.3 Formen der AMD

Die AMD kann abhängig von histopathologischen Merkmalen in verschiedene Untergruppen unterteilt werden. Die frühe AMD ist durch viele kleine (bis 65µm) und eine bzw. mehrere intermediäre (65µm bis 125µm) Drusen gekennzeichnet. Bei der intermediären Form der AMD kommt es zum Auftreten von mehreren intermediären Drusen und einer bzw. mehreren großen Drusen (über 125µm). Zudem sind die großen Drusen häufig von einer Hyper- und/oder Hypopigmentierung des RPEs begleitet. Die fortgeschrittenen Formen der AMD werden in die geographische Atrophie („trockene“) und die exsudative („feuchte“) Form unterteilt. Beide Formen der fortgeschrittenen AMD können sich im gleichen Auge manifestieren. (Schmitz-Valckenberg et al., 2014)

Risikofaktoren für einen chronischen Verlauf sind weiche, große konfluierende Drusen, fokale Hyperpigmentationen und systemisch eine arterielle Hypertonie (Lang 2008).

1.1.3.1 Geographische Atrophie

Die geographische Atrophie, auch als „trockene“ oder nicht-exsudative Form der fortgeschrittenen AMD bezeichnet, tritt bei 85-90 % der Patienten auf. Hierbei kommt es zu einer langsamen Atrophie des RPE und der Choriokapillaris, welche mit einem Untergang der Photorezeptoren einhergeht, sowie zu einer Ablagerung von Stoffwechselprodukten in der Bruch`schen Membran (Drusen) (Eagle et al. 1984).

1.1.3.2 Feuchte AMD

Die feuchte (exsudative) AMD tritt nur in 10-15% der Fälle auf, ist aber trotzdem für etwa 90% der Fälle von Blindheit nach dem Gesetzgeber verantwortlich (Ferris et al. 1984, Moshfeghi et al. 2003). Bei dieser Form kommt es zu choroidalen Neovaskularisierungen (CNV), die die Bruch`sche-Membran durchbrechen und zwischen Bruch`scher Membran und RPE (Typ 1) oder zwischen RPE und Netzhaut (Typ 2) wachsen. Hierdurch kann es zu Flüssigkeitsaustritt und Lipidablagerungen kommen. Die Folge ist oft eine Abhebung des RPE von der Choroidea und die Entstehung eines Makulaödems (de Jong PT 2006, Hageman et al. 2001, Zarbin MA 2004, Donoso et al. 2006, Grossniklaus et al. 2004, Anderson et al. 2002, Kijlstra et al. 2005). Die neovaskuläre Form mit Makulaödem macht sich durch einen plötzlichen Visusverlust, Metamorphopsien und Mikropsie oder Makropsie, sowie Störungen im Kontrast- und Farbsehen bemerkbar. Bei der ophthalmoskopischen Untersuchung fallen

ein unregelmäßig begrenzter gräulicher Bezirk und kleinere oder größere Netzhautblutungen auf. In der Spätphase der neovaskulären AMD breitet sich der Prozess bis zu den großen Gefäßbögen aus und es kann zu großen subretinalen Blutungen kommen. Die Spätform und gleichzeitig die Endstufe der AMD stellt die Entstehung von weißlich, fibrösen Narben, nicht selten mit kranzförmig angeordneten Lipidexsudationen (Junius-Kuhnt-Makulopathie) (Grehn 2008) dar. Dieses Stadium führt zu einem irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe.

Es werden verschiedene Ursachen für die Einsprossung der Gefäße aus der Choriokapillaris vermutet. So werden poröse Schädigungen der Bruch'schen Membran durch kumulierende Stoffwechselprodukte wie dem Lipofuszin am angrenzenden Pigmentepithel diskutiert. Auch eine Verdickung der alternden Bruch'schen Membran kann durch einen verminderten Sauerstoff- und Nährstofftransport aus der Choriokapillaris zu einer Hypoxie des RPE und der äußeren Netzhautschichten führen. (Penfold et al. 1985, Young et al. 1987). Die Zellen des RPEs haben die Möglichkeit angiogenetische Faktoren wie den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu bilden, der eine weitere Stimulation der vaskulären Proliferation bewirkt. (Holz et al. 1997). Unbehandelt führt eine CNV nahezu immer zur Ausbildung einer Narbe im Bereich der Makula mit irreversiblen Verlust der zentralen Sehfähigkeit.

1.1.4 Submakuläre Blutungen (SMB)

Bei der feuchten AMD kann es zudem zu einer akuten submakuläre Blutung (SMB) im Bereich der Makula aus den pathologischen Blutgefäßen der CNV mit plötzlichem Verlust der zentralen Sehfähigkeit und nachfolgender Schädigung der Fotorezeptoren kommen. Das Ausmaß der Symptome hängt stark von der Lokalisation der Blutung ab. Betrifft die SMB die zentralen Bereiche der Netzhaut, insbesondere die Makula, so kann es zu einer plötzlichen Verschlechterung des Sehvermögens kommen. So sind verschwommene Flecken oder ein fleckförmiger Ausfall (Skotom) im Zentrum des Bildes möglich. Ebenso kann es zu Verzerrungen (Metamorphosie) von betrachteten Objekten kommen. Große Blutungen können zu einem kompletten Sehverlust auf dem betroffenen Auge führen. Betrifft die SMB jedoch die peripheren oder extrafovealen Bereiche der Netzhaut kommt es oft zu keiner oder nur zu einer minimalen Verschlechterung des Sehvermögens. Die zentrale Sehschärfe bleibt vollständig intakt und kleinere Skotome im peripheren Gesichtsfeld werden kaum bemerkt. Es ist daher wichtig Patienten mit prädisponierenden Vorerkrankungen über die Symptome einer SMB gründlich aufzuklären. Insbesondere Patienten mit bereits bestehender AMD bemerken

die Symptome einer SMB oft nicht, da diese bereits auf Grund der AMD vorliegen und das Sehvermögen der Patienten ohnehin schon stark eingeschränkt sein kann.

Genauere Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz der SMB liegen, trotz einiger großen Studien zur SMB bei AMD (Steel, Sandhu, 2013), nicht vor. Da der deutlichen Mehrzahl der SMB eine AMD zu Grunde liegt, kann man die Prävalenzdaten der AMD als Anhaltspunkte nehmen. Laut Ziemssen et al. (2006) sind in Deutschland etwa 4,5 Millionen Menschen an einer Form der AMD erkrankt. In der ANCHOR-Studie (Brown et al. 2009) wird ein Patientenkollektiv von 423 an CNV bei AMD Erkrankten genannt. Die MARINA-Studie (Rosenfeld et al. 2006) beinhaltet insgesamt 716 Patienten, die an einer CNV bei AMD erkrankt sind. Bis zu 40 % der Patienten, bei denen eine AMD mit einer Ablösung des retinalen Pigmentepithels einhergeht, erleiden im Verlauf eine submakuläre Blutung (Poliner et al. 1986).

Verschiedene Mechanismen führen bei der SMB zum Sehverlust. So kommt es bei dem sogenannten Hindernis-Effekt zu einer Transportstörung durch die SMB in deren Folge Nährstoffe die Retina nicht erreichen können (Glatt et al. 1982). Hieraus ergibt sich ein Zusammenhang zwischen der Dicke der Blutung und der Visusprognose (El Baba et al. 1986). Ein weiterer Mechanismus ist der Traktionseffekt. Bei diesem Mechanismus führt das geronnene Blut durch die Fibrinbildung zu einer Schrumpfung der äußeren Netzhautschichten (Glatt et al. 1982, Toth et al. 1991). Das gebildete Fibrin verbindet sich mit den Photorezeptoraußensegmenten. Im Verlauf kann es zu einem Zerreißen der Photorezeptoraußensegmente durch die Kontraktur der Fibrinfäden (Toth et al. 1991) kommen. Bei dem toxischen Effekt kommt es während des Abbaus der SMB zur Freisetzung von toxischen Substanzen wie Fibrin (Toth et al. 1991), Eisen (Bhisitkul et al., 2008) und Hämosiderin (El Basa et al., 1986). Eine toxische Schädigung der Netzhaut konnte bereits nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Glatt et al., 1982).

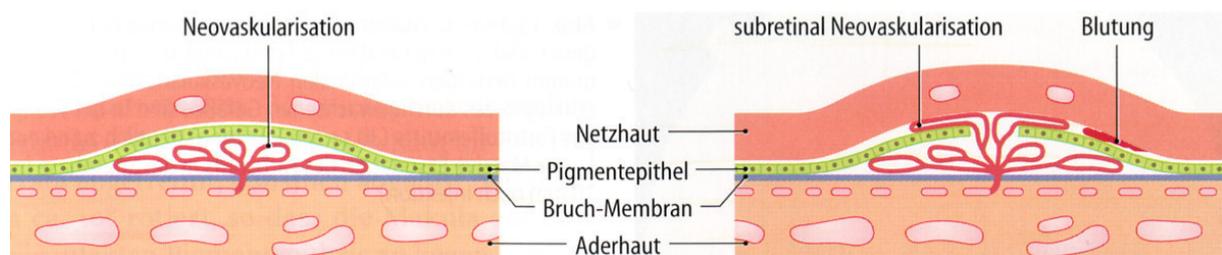


Abbildung 1: Schematische Darstellung der subretinalen Neovaskularisation bei AMD (aus Augenheilkunde Grehn 2002, mit freundlicher Genehmigung des Springer Verlags)

1.1.5 Diagnostik

Zu Beginn der Diagnostik wird neben einer ausführlichen Anamnese, einer Sehschärfenbestimmung und einer Spaltlampenuntersuchung meistens auch ein Amsler-Test zum frühzeitigen Erkennen von Metamorphopsien durchgeführt. Zur genaueren Diagnostik schließt sich häufig eine Fundusfotografie und/oder eine Untersuchung mit optischer Kohärenztomografie (OCT) an. Die Zuordnung zum Stadium ist mit Hilfe der Fluoreszenzangiographie möglich. Ziel des OCT und der Fluoreszenzangiographie ist die Differenzierung der fortgeschrittenen AMD. (Leitlinie Nr. 21 AMD des BVA und der DOG e.V.)

1.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der Gefäßwachstumsfaktor VEGF ist einer der wichtigsten Regulatoren von gesunder und kranker Angiogenese (Ferrera 2009). Zu den Untergruppen von VEGFs gehören VEGF-A bis -F und der *Placenta Growth Factor* (Holmes et al. 2005, Yamazaki et al.2006). Wie in der Literatur allgemein üblich, wird VEGF-A auch in dieser Arbeit synonym mit dem Begriff „VEGF“ verwendet. VEGF ist ein Glykoprotein das für verschiedene Funktionen wie z.B. die Beeinflussung der Permeabilität (Senger et al. 1983), Migration, Proliferation (Ferrara und Davis-Smyth 1997) und die Stickstoffmonoxidbildung (Kroll und Waltenberger 1998) in Endothelzellen verantwortlich ist. VEGF vermittelt die Signaltransduktion über Tyrosinkinaserzeptoren (Neufeld et al. 1999). Im Auge produziert retinales Gewebe VEGF (Nishijima et al. 2007). Hier wirkt VEGF zum einen neuroprotektiv auf die Retina und das RPE (Nishijima et al. 2007, Byeon et al. 2010) als auch chemotaktisch auf Monozyten (Clauss et al. 1990) und dient weiterhin zur Erhaltung der Choroidea (Marneros et al. 2005).

Es gibt vier Hauptformen des Glykoproteins VEGF, die sich in ihrer Anzahl an Aminosäuren und dem unterschiedlichen Molekulargewicht unterscheiden. Die Isoformen VEGF 189 und VEGF 206 sind hoch basisch und binden an Heparin. Die Isoformen VEGF165 und VEGF 121 sind frei diffusionsfähig. Die Isoform VEGF121 bindet nicht an Heparin. (Ferrara et al. 2003). Alle extrazellulären VEGF Isoformen können von Plasmin zu VEGF 110 gespalten werden, das frei diffusionsfähig ist (Kaiser et al. 2006, Keyt et al. 1996).

Hypoxie fördert die Synthese von VEGF und erhöht die Permeabilität einzelner Gewebeschichten, so dass es zu einer besseren Diffusionsfähigkeit kommt. Dieser Mechanismus ermöglicht unter anderem ein schnelleres Erreichen des Ziels, eine endotheliale

Zellproliferation, das Überleben und die Migration der Zellen ermöglicht. (Ambati et al. 2003). VEGF verursacht zudem eine vaskuläre Hyperpermeabilität, die das Zellwachstum begünstigt. Zudem setzt VEGF Substanzen wie *tissue Plasminogen Activators* und die zu den Metalloproteinasen gehörende interstitielle Kollagenase frei, die die extrazelluläre Matrix durch Spaltung von Peptidbrücken schädigen und das Einwandern von endothelialen Zellen fördern. (Pepper et al. 1991, Mignatti et al. 1996, Wang et al. 1998, Pufe et al. 2004). VEGF ist ein entscheidender Faktor bei Entstehung und Wachstum von CNV bei exsudativer AMD (Spilsbury et al. 2000).

1.3 Therapiemöglichkeiten der exsudativen AMD

Es gibt verschiedene Behandlungsmöglichkeiten bei exsudativer AMD. Historisch zählen dazu die photodynamische Therapie (PDT) und die thermische Laserkoagulation.

Bei der PDT wird der Farbstoff Verteporfin appliziert, der sich selektiv in den subfovealen chorioidalen Neovaskularisationen anreichert. Nach Aktivierung des Farbstoffes durch einen Laser kommt es zur Bildung von phototoxischen Radikalen, die über eine Schädigung des Endothels zu einer Photothrombose innerhalb der CNV führen. Allerdings geht diese Therapiemöglichkeit mit einer hohen Rezidivrate und einer Atrophie des RPEs einher (Holz et al., 2011).

Bei der Laserkoagulopathie kommt es zu einer Verödung der Gefäße durch Erhitzung.

Der Laser zerstört bei seinem Auftreffen auf die Netzhaut jedoch nicht nur die CNVs, sondern auch das retinale Gewebe, so dass ein deutliches Skotom entsteht und eine Einschränkung des Gesichtsfeldes in Kauf genommen werden muss. Außerdem hat die Laserkoagulation nur dann eine günstige Prognose, wenn wenige, klar abgrenzbare Neovaskularisationen vorhanden sind – also nur bei einer frühen Form der feuchten AMD (Virgili G, Bini A, 2007).

Zu den operativen Verfahren der Behandlung der AMD zählen die Membranextraktion, die Makulatranslokation und der RPE-Patch. Bei der Membranextraktion geht das alleinige Entfernen der CNV Membran mit einer irreversiblen Beschädigung des RPE, der Bruchmembran und der Choriokapillaris einher. Folglich degenerieren die fovealen Photorezeptoren, wodurch eine postoperative Visusrehabilitation in der Regel nicht zu erwarten ist (Eckardt et al. 1996, Gass et al. 1994, Hawkins et al. 2004, Thomas et al. 1994). Bei der Makulatranslokation wird die zentrale Netzhaut auf gesundes, paramakulär gelegenes

RPE rotiert. Hierbei hat sich gezeigt, dass extrafoveales RPE die Funktion der fovealen Photorezeptoren unterstützen kann (Aisenbrey et al. 2002, Eckardt et al. 1999). Aufgrund der hohen Komplikationsrate (proliferative Vitreoretinopathie, Diplopie, Makulaödem) hat sich dieses Verfahren nicht durchsetzen können. Bei dem RPE-Patch wird gesundes RPE unter die foveale Netzhaut gepflanzt. Diese Transplantation führt jedoch zu Immunreaktionen mit subretinaler Fibrose und es zeigte sich keine substantielle Visusverbesserung (Algvere et al. 1994, Algvere et al., 2006). Auf Grund von hohen Komplikationsraten und meist fehlender Sehverbesserung konnten sich die operativen Verfahren nicht durchsetzen und werden nur noch in Einzelfällen durchgeführt.

Hingegen konnte sich in jüngster Vergangenheit die Behandlung der AMD mit intravitreal applizierten VEGF-Antagonisten etablieren. VEGF-Antagonisten binden extrazellulär an das VEGF und verhindern so die Bindung an den Rezeptor. Zu den aktuell in der Klinik als Mittel der Wahl verwendeten VEGF - Antagonisten zählen Ranibizumab und Aflibercept, die als gleichwertig in ihrer Effektivität bezüglich des Visus gelten (Stellungnahme DOG, BVA, 2014). Bevacizumab als *off-label-use* bietet eine ähnliche Effektivität und ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum wie Ranibizumab und Aflibercept (Moja L. et al., 2014). Unter 1.4.2 wird in dieser Arbeit genauer auf Bevacizumab eingegangen. Es wird in der aktuellen Stellungnahme zur Anti-VEGF Therapie bei neovaskulärer AMD empfohlen, die Patienten nach einem individuellen Plan zu behandeln. Grundlage für den Behandlungsplan ist die engmaschige Kontrolle mittels optischer Kohärenztomografie. Nach den ersten drei Injektionen, die im Abstand von einem Monat erfolgen, kommt es zur monatlichen Kontrolle und abhängig von den hier erhobenen Befunden zu einer erneuten Injektion. Patienten, bei denen diese Medikamente das Wachstum der CNV nicht hemmen können (Therapieversager) und Patienten bei denen es zu großen subretinalen Blutungen oder Einrissen des RPE im Verlauf der AMD kommt leiden unter der unaufhaltsamen Progression der Erkrankung mit irreversiblen Verlust der zentralen Sehschärfe (Lim JH et al., 2012).

1.4 Therapiemöglichkeiten bei exsudativer AMD mit akuter submakulärer Blutung

Die SMB selbst wurde anfänglich chirurgisch während der Extraktion der der Blutung zugrunde liegenden subretinalen CNV-Extraktion ausgespült. Allerdings zeigte dieses Verfahren nicht die gewünschten Erfolge, weil bei der CNV-Extraktion unvermeidlich auch das RPE aus dem Bereich der Makula mit entfernt wird (Vander et al. 1991, Bressler et al.

2004). Mittlerweile wird das *recombinant tissue Plasminogen Activator* (rtPA) genutzt um das subretinal geronnene Blut durch Aktivierung der Fibrinolyse zu verflüssigen und dann aus der Fovea verdrängen zu können. Hierfür stehen im Wesentlichen zwei Vorgehensweisen zur Verfügung. Zum Einen kann durch die intravitreal Injektion eine rtPA-Lösung mit nachfolgender Gasblase (Chen et al. 2007, Hesse et al. 1999, Handwerger et al. 2001) eine Verdrängung der SMB erfolgen oder zum Anderen durch die subretinale Injektion von rtPA im Rahmen einer Pars-plana-Vitrektomie (ppV), gefolgt von einer intravitrealen Gastamponade (Hauptert et al. 2001, Olivier et al. 2004, Hillenkamp et al. 2010, Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012). Bei der ppV wird der Glaskörper über drei kleine Inzisionen auf Höhe der Pars Plana entfernt. Nach einem solchen Eingriff bessert sich oft die Sehfähigkeit zunächst auf Grund der Verdrängung der SMB aus der Fovea. Nach einiger Zeit kommt es jedoch meistens wieder zu einer Verschlechterung der Sehfähigkeit, da die der SMB zugrunde liegende CNV fortschreitet und es dadurch zu einem irreversiblen Verlust der zentralen Sehfähigkeit kommt.

Ausgehend von den guten Ergebnissen der anti-VEGF-Therapie bei exsudativer AMD (Ip et al. 2008, Schouten et al. 2009), entstand das neue Therapiekonzept der gemeinsamen Applikation von rtPA und einem VEGF-Antagonisten (Ko-Applikation). Hierbei kommt es nach ppV, zuerst zu einer Injektion von rtPA mit direkt anschließender Gabe von Bevacizumab. Abschließend erfolgt eine Gastamponade. Den ersten postoperativen Tag sollten die Patienten in Bauchlage verbringen. Ziel ist es, mit der Gabe von rtPA eine Verdrängung der SMB aus der Fovea und damit eine Reduktion der toxischen Effekte des Blutes zu erreichen (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012, Meyer et al. 2008, Guthoff et al. 2011). Die gleichzeitige Gabe eines VEGF-Antagonisten soll das Fortschreiten der CNV zu einem möglichst frühen Zeitpunkt aufhalten (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012, Meyer et al. 2008, Guthoff et al. 2011). Erste klinische Studien zur subretinalen Koapplikation von rtPA und einem VEGF-Antagonisten zeigten viel versprechende Ergebnisse (Treumer et al. 2010, Treumer et al. 2012).

Bisher gibt es noch keine prospektive, randomisierte und kontrollierte klinische Studie mit hohem Evidenzlevel, die klären konnte, ob eine Verdrängung der SMB häufiger durch intravitreale oder subretinale Applikation erfolgte. Es gibt jedoch kleinere Fallserien, in denen die subretinale Applikation häufiger SMB verdrängt als eine intravitreale Applikation (Hillenkamp et al. 2010). Tierversuche konnten zeigen, dass Bevacizumab, trotz höherem

Molekulargewicht als das experimentell bestimmte Molekulargewicht für transretinale Diffusion, durch die Netzhaut diffundieren kann (Jackson et al. 2003, Heiduschka et al 2007). Dies vermutlich aber deutlich verlangsamt (Jackson et al. 2003). Weiterhin unklar ist auch, ob rtPA nach intravitrealer Injektion durch die Netzhaut diffundiert. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass rtPA nicht durch gesunde Netzhaut diffundiert (Kamei et al 1999). In einer anderen Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass ähnliche große Moleküle wie z.B. Albumin durch pathologisch veränderte Netzhaut diffundiert (Takeuchi et al. 1994). Auch vorstellbar ist, dass die SMB eine Diffusion behindert. Somit ist nicht klar, ob nach intravitrealer Injektion von Bevacizumab und rtPA, beide Medikamente in ausreichender Menge und Konzentration um therapeutisch wirksam zu sein die subretinale Blutung erreichen. Hingegen kann bei der ebenfalls sicherer subretinale Gabe von Bevacizumab und rtPA von therapeutisch wirksamer Dosierung ausgegangen werden.

Unklar blieb bei der gleichzeitigen subretinalen Injektion von Bevacizumab und rtPA bislang, ob beide Wirkstoffe miteinander kompatibel sind. Als Serinprotease könnte rtPA selbst, durch rtPA aktiviertes Plasmin oder auch unbestimmte, durch die Fibrinolyse aktivierte Proteasen zu einer intraoperativen Spaltung oder Inaktivierung des Bevacizumabs führen.

1.4.1 „recombinant tissue Plasminogen Activator“(rtPA, Actilyse®)

Nach intravitrealer Injektion des Fibrinolytikums rtPA bei Patienten mit subretinaler Hämorrhagie konnte eine Fibrinolyse beobachtet werden.

rtPA ist eine Fibrin-spezifische 527 Aminosäuren große Serinprotease. rtPA entspricht der körpereigenen aus dem Endothel freigesetzten Serinprotease *tissue Plasminogen Activator* (tPA). rtPA wandelt das Plasmaglobulin Plasminogen durch enzymatische Spaltung in Plasmin um. Plasmin, ebenfalls eine Serinprotease, wiederum spaltet die Fibrinpolymere, die den Thrombus zusammenhalten, in kleinere Fibrinspaltprodukte. Des Weiteren spaltet Plasmin Fibrinogen, Prothrombin und die Faktoren V, VIII, IX, XI und XII. Außerdem hemmen die Fibrinspaltprodukte Thrombin und Neubildung von Fibrin. rtPA erlangt erst nach Bindung an Fibrin ihre volle proteolytische Aktivität und zeichnet sich somit durch eine hohe Thrombusselektivität aus (Herdegen et al., 2008). Serinproteasen besitzen im aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat. rtPA hat im Bereich der β -Kette (leichte Kette) sein katalytisches Zentrum und spaltet hinter der Aminosäure Arginin. rtPA

spaltet neben Plasminogen, auch andere Proteine wie *Hepatocyte Growth Factor* (Mars et al. 1993) oder *Platelet Derived Growth Factor* (Su et al. 2008). Die Plasma Halbwertszeit von rtPA beträgt lediglich 4-5 Minuten. In anderen Kompartimenten kann sich die Halbwertszeit bis auf 40 Minuten ausdehnen. Als unerwünschte Wirkung können unter rtPA-Therapie Hämorrhagien auftreten.

Hesse konnte 2001 zeigen, dass bei flachen Blutungen, die unter 0,8 mm Dicke waren, keine größeren Änderungen durch die rtPA-Injektion zu beobachten waren. Jedoch zeigte sich eine deutliche Verflüssigung des Koagels bei dickeren Blutungen. Weiterhin stellte Hesse fest, dass durch die Hämorrhagien Abhebungen der Retina und als Folge dessen Netzhautdefekte entstehen. So kann rtPA, trotz seines Molekulargewichtes von 70 kDa durch die Retina penetrieren. Die Fibrinolyse durch rtPA findet innerhalb von 24 Stunden nach Injektion statt. Somit ist eine zügige Intervention nach Auftreten der ersten Symptome notwendig. (Hesse 2001)

1.4.2 VEGF-Antagonist Bevacizumab (Avastin®)

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper sowohl mit einem Fab- als auch mit einem Fc-Fragment und mit einer Größe von 150 kDa deutlich größer als Ranibizumab. Pharmakotherapeutisch gehört Bevacizumab zur Gruppe der antineoplastischen und immunmodulierenden Medikamente. Es blockiert speziell die Isoformen von VEGF-A. Die Bindung von VEGF-A an die VEGF-Tyrosin-Kinase- Rezeptoren FLT1 (auch VEGFR-1 genannt) und KDR (auch VEGFR-2 genannt) auf der Oberfläche von Endothelzellen ist essentiell für eine funktionierende Angiogenese und Vaskulogenese (Bhaskara et al., 2008). Durch die Bindung an VEGF verhindert Bevacizumab die Neubildung von Gefäßen und bewirkt eine Rückbildung neu entstandener unreifer Gefäße. Zudem kommt es zu einer Normalisierung der Gefäßpermeabilität (Willett et al., 2004). Die Halbwertszeit von Bevacizumab im Plasma ist im Vergleich zu Ranibizumab deutlich länger und auch die Serumkonzentration ist höher (Stewart et al., 2012). Nach intravenöser Applikation ist eine Halbwertszeit von 20 Tagen in der Fachinformation des Herstellers Roche Pharma AG beschrieben. Der Abbau von Bevacizumab erfolgt proteolytisch.

Aktuelle Studien wie die CATT-Studie oder die MANTA-Studie zeigten, dass eine wiederholte intravitreale Applikation von Ranibizumab und Bevacizumab sowohl bezogen auf den bestmöglichen Visus, als auch auf die retinale Dicke und auf die Größe der Läsion zu

vergleichbaren funktionellen und morphologischen Ergebnissen führt (CATT Research Group et al. 2011).

Nach intravitrealer Gabe kam es gelegentlich zu Nebenwirkungen wie intraokulären Infektionen (infektiöse Endophthalmitis, Uveitis und Vitritis), Retinaablösungen, Risse im RPE, intraokuläre Hämorrhagien (Glaskörperblutungen, Retinablutungen) und zur Steigerung des intraokulären Druckes. (Fachinformation Roche Pharma AG)

Es gibt Hinweise auf systemische Nebenwirkungen wie nicht-okulare Hämorrhagien und thrombembolische Ereignisse, unter anderem Myokardinfarkt und Apoplex, bei der Behandlung mit VEGF-Inhibitoren (Chen & Cleck 2009).

1.5. Plasmin

Plasmin ist eine zweikettige Serinprotease, die durch die Plasminogenaktivatoren tPA und Urokinase (uPA) durch proteolytische Spaltung aus Plasminogen entsteht. Plasminogen ist ein Glykoprotein bestehend aus 791 Aminosäuren und wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Aber auch andere Organe wie die Nieren, die Nebennieren, Gehirn, Herz oder Lunge können geringe Mengen Plasminogen synthetisieren. Das aktive Zentrum des Plasmins ist auf der leichten Kette zu finden. Hauptaufgabe von Plasmin ist die Spaltung von Fibrin. Des Weiteren wirkt Plasmin autokatalytisch. Es spaltet Plasminogen zu Plasmin. Aber auch andere extrazelluläre Matrixmoleküle wie z.B. die Proteoglykane werden gespalten. Außerdem aktiviert Plasmin Promatrixmetalloproteinasen, die wiederum Matrixmoleküle abbauen. (Pöttsch, Madlener et al., 2010)

2 Zielsetzung

Die exsudative AMD ist die häufigste Ursache einer akuten SMB. Sie führt unbehandelt zu einer Makulanarbe und damit zu einer irreversibel stark eingeschränkten Sehfähigkeit. Der Einsatz von VEGF-Antagonisten konnte bereits gute Ergebnisse in der Therapie der exsudativen AMD erzielen und auch die Kombination aus rtPA und VEGF- Antagonisten zeigte in den ersten klinischen Studien vielversprechende Ergebnisse. Jedoch war unklar, ob der VEGF-Antagonist Bevacizumab mit dem Fibrinolytikum rtPA bei gleichzeitiger Gabe kompatibel ist. Als Protease könnte rtPA selbst, oder aber auch durch rtPA aktiviertes Plasmin, oder auch unbestimmte, während der Fibrinolyse aktivierte Proteasen Bevacizumab spalten und gegebenenfalls auch funktionell inaktivieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Etablierung eines in-vitro Modells zur subretinalen Ko-Applikation von Bevacizumab und rtPA als auch der Untersuchung der strukturellen Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin. Des Weiteren wurde die funktionelle Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin in einem in-vitro Modell der submakulären Blutung untersucht.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 1: verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma (Herkunft)
Abzüge	Antair BS	A.Sternkopf GmbH (Lübeck)
	Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH & Co.KG (Uetze/ Hänigsen)
Brutschrank	Brutschrank	Labotect (Göttingen)
Gelkammersystem	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
	Tetra-Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Geldokumentation	Bio-Image System	ChemoBis, Biostep (Jahnsdorf)
Glasplatten für	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Gelelektrophorese	Glass Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
OCT	Spectralis HRA+OCT	Heidelberg Engineering (Heidelberg)
Pipetten	Research®	Eppendorf AG (Hamburg)
Saugpumpen	Vacunsafe comfort	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Schüttler	Rocking platform	VWR (Pennsylvania, USA)
Stromversorgungsgerät	Electrophoresis-power-supply	Consort nv (Turnhout, Belgien)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage	Waage	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Zellkulturschalen	Nunclon™	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
	ΔSurface	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)

Zellschaber	Zellschaber	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Zentrifuge	Centrifuge 5414	Eppendorf AG (Hamburg)
	Heralus Fresco 17	Thermo Elektron Corporation (Erlangen)

3.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung	Firma (Herkunft)
Acrylamid	30% Acrylamide/ Bis Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Ethanol	Ethanol 99%	Büfa Chemikalien GmbH & Co.KG (Hude)
APS	Ammoniumperoxidisulfat	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycin	Glycerin 87%	Merck KGaA (Darmstadt)
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)
Säuren	Essigsäure 100%	Merck KGaA (Darmstadt)
SDS	Natriumdodecylsulfat	Merck KGaA (Darmstadt)
TEMED	Tetramethyldiamin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
TRIS	Trizma®Base Trizma®Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tween	Tween-20	Merck KGaA (Darmstadt)
Sensitizer	Silver Stain Sensitizer	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology (Illinois, USA)
Enhancer	Silver Stain Enhancer	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology (Illinois, USA)

Stain	Silver Stain	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology (Illinois, USA)
Developer	Silver Stain Developer	Thermo Fisher Scientific Pierce Biotechnology (Illinois, USA)
Coomassie	Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Destain	Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Soln	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

3.3 Sonstige Materialien

Tabelle 3: Sonstige verwendete Materialien

Sonstige Materialien	Bezeichnung	Firma (Herkunft)
Aqua bidest	Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Betaisodona		Mundipharma GmbH (Limburg)
Falcon-Röhrchen	Centrifuge Tubes	VWR (Pennsylvania, USA)
Filterpapier	Whatmanfilter	Macherey-Nagel (Düren)
Größenmarker	Roti-Marker	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)
Inhibitor	Bevacizumab	Roche Deutschland Holding GmbH (Grenzach-Wyhlen)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Plasmin	Plasmin from human plasma, \geq 2 units/mg protein	Sigma (München)
rtPA	Actilyse®	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (Ingelheim)
Sample Buffer	4x SDS Sample Buffer	Merck KGaA (Darmstadt)
Software	TotalLab Software	Nonlinear Dynamics (Durham, NC, USA)

Trypsin		PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Trypsin-EDTA		PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
VEGF-ELISA Kit	Quantikine®	R & D Systems GmbH (Wiesbaden)
Zellulose	Cellophan	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe)

3.4 Berechnung des Volumens von SMB

Zur Berechnung des durchschnittlichen Volumens von SMB bei exsudativer AMD wurden aus insgesamt 40 Fällen 12 Fälle von SMB mit Beteiligung der Fovea und einer maximalen Anamnese von 14 Tagen herausgesucht, die prä- und postoperativ Aufnahmen der Retina hatten. Fläche und Dicke der SMB wurden mit Hilfe von Fundus-Fotografien oder Infrarot-Fundusfotografie, Fluoreszenzangiografie mittels Heidelberg Retina Angiografie (HRA) und optischer Kohärenztomografie (OCT) gemessen. OCT und HRA zeigten hier eine deutlich bessere Bildqualität.

Mit Hilfe der Formel $V = \frac{1}{6} \pi h \cdot (3a^2 + h^2)$ zur Berechnung des Volumens eines Kugelabschnittes konnten die Volumen der SMB berechnet werden (Tafelwerk, 2002).

Die Ausdehnung der Grundfläche der SMB wurde in Papillendurchmessern angegeben.

3.4.1 Fundusfotografie

Bei der Fundusfotografie handelt es sich um eine Untersuchungsmöglichkeit, die der Erkennung, Dokumentation und Verlaufsbeobachtung retinaler Läsionen dient. Die Funduskamera setzt sich aus Spiegelreflexkamera, Blitzlampe und einem lichtstarken Linsensystem zusammen. Fotografiert wird mit rotfreiem Licht, wodurch Details der retinalen Gefäße wie Mikroaneurysmen und kleinere Blutungen sowie Veränderungen der Innenschicht der Netzhaut dargestellt werden können. (Sachsenweger 2003)

3.4.2 Infrarot-Fundusfotografie

Die Infrarot-Fundusfotografie entspricht in vielen Punkten der Fundusfotografie, jedoch wird statt des weißen Blitzlichtes eine Lichtquelle im nicht-sichtbaren Spektralbereich genommen. Dies hat den Vorteil, dass die Untersuchung für die Patienten deutlich angenehmer ist. Des Weiteren durchdringt Infrarotlicht trübe Medien besser als Weißlicht. Zudem kann Infrarotlicht epiretinale Membrane und zystoide Makulaödeme kontrastreicher darstellen als Weißlicht und rot-freie Bildgebung. (Heidelberg Engineering, Heidelberg)

3.4.3 Optische Kohärenztomografie (OCT)

Die optische Kohärenztomografie ist ein bildgebendes Untersuchungsverfahren, das mit Licht geringer Kohärenzlänge und mit Hilfe eines Interferometers Abstandsmessungen der vom Gewebe reflektierten elektromagnetischen Wellen durchführt. Die einzelnen axialen Aufnahmen (A-Scans) werden entweder zirkulär oder linear aneinander gereiht wodurch ein 2-Dimensionales Schnittbild entsteht (B-Scan). Außerdem kann ein 3-dimensionales Bild aus mehreren versetzten B-Scans berechnet werden. Durch diese Technik ist es möglich einen histologischen Schnitt nicht invasiv in vivo darzustellen. Die einzelnen Netzhautschichten sowie die äußere Grenzmembran werden abgebildet. Somit können Abhebungen des RPEs, intraretinale Ödeme, vitreoretinale Traktionen und Nervenfaserbündeldefekte dargestellt werden (A.Burk, R. Burk, 2014). Das OCT zeichnet sich durch eine gute Validität und Reproduzierbarkeit aus (Hee et al. 1996, Puliafito et al. 2004, Toth et al. 1997).

3.4.4 Fluoreszenzangiographie

Bei der Fluoreszenzangiographie werden mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes die Gefäße des Augenhintergrundes dargestellt. Hierzu wird meistens der Farbstoff Fluoreszein verwendet. Fluoreszein leuchtet in blauem Licht hell auf und stellt insbesondere die retinale Gefäße dar. Als alternativer Farbstoff kommt gelegentlich Indozyanin-Grün zum Einsatz. Dieser Farbstoff fluoresziert durch infrarotes Licht und kommt vor allem bei der Darstellung der Gefäße der Aderhaut zum Einsatz.

Durch diese Darstellung fallen auch pathologische Gefäßabschnitte wie Aneurysmen oder choroidale Neovaskularisationen auf. Diese Veränderungen werden insbesondere in der Frühphase der Angiographie (bis etwa 1 Minute nach intravenöser Injektion des Farbstoffes) dargestellt. In der venösen und spätvenösen Phase der Angiographie (5-10 Minuten nach intravenöser Injektion des Farbstoffes) fallen insbesondere Defekte der Arterienwände bzw. Störungen der Blut-Retina-Schranke (wie z.B. bei Blutungen oder Exsudaten) durch den Austritt des Farbstoffes aus den Gefäßen auf. Eine SMB zeigt sich durch eine wolkige, unscharf begrenzte Farbstoff-Ansammlung außerhalb der Gefäße. Genaue Aussagen zu den Gefäßverläufen sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich.

In dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzangiographie mittels Heidelberg Retina Angiographie (HRA) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein konfokales Laser-Scanning-System für die digitale Fluoreszein- und Indozyanin-Grün-Angiographie. Das Gerät ermöglicht eine Bildfrequenz von bis zu 20 Bildern pro Sekunde. Zusätzlich ist es möglich Bilder der retinalen Autofluoreszenz aufzuzeichnen, die Rückschlüssen über den Lipofuszingehalt im RPE ermöglichen.

3.5 Probenansätze

In Anlehnung an die klinisch verwendeten Konzentrationen (Hillenkamp et al. 2010, Treumer et al. 2010) wurde für jeden Versuch dasselbe Mischverhältnis wie intraoperativ verwendet.

So wurde insgesamt ein 20 µl Gemisch, bestehend aus 10 µl (250 µg) Bevacizumab und 10 µl (2 µg) rtPA, für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Verwendung bei der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde diese Probe auf 1:10 und 1:100 verdünnt.

Um die Wechselwirkung von Bevacizumab und Plasmin zu prüfen, wurde humanes Plasma mit einer Konzentration von ≥ 2 Units/mg benutzt. 150 µg Plasmin wurden in 150 µl Aqua bidest gelöst. Da die genaue Konzentration von Plasmin in SMB nicht sicher bestimmbar ist, wurden zwei unterschiedliche Plasminkonzentrationen verwendet. Gemisch 1 enthielt 5 µl (125 µg) Bevacizumab und 5 µl (0,2 µg) Plasmin. Das Gemisch 2 bestand aus 5 µl (125 µg) Bevacizumab und 5 µl (2µg) Plasmin. Beide Gemische hatten insgesamt ein Volumen von 10 µl und wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Auch hier wurden die Proben für die

Verwendung bei der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE-Gelelektrophorese) auf 1:10 und 1:100 verdünnt.

Als Kontrollproben wurden Bevacizumab (250 µg/10 µl), rtPA (10 µg/10 µl) und Plasmin (4 µg/ 10µl) jeweils mit NaCl in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung ebenfalls für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens drei Mal durchgeführt.

3.6 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE-Gelelektrophorese)

Bei der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE-Gelelektrophorese) handelt es sich um eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Hierbei führt das anionische Detergenz SDS dazu, dass die Proteine denaturieren und proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladungen tragen. Somit können sie im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in zwei miteinander verbundenen Gelen, die unterschiedliche Zusammensetzungen und Funktionen hatten. Zunächst wurden im Sammelgel die Proteine zu Banden formiert und anschließend im Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Der Acrylamid-Anteil im Trenngel betrug 12 %. (Zell- und Molekularbiologie im Überblick, Boujard D. et al., 2014).

Bevor es zum Auftragen der Proben in die Geltaschen kam, wurden jeweils 9 µl Probe mit 3 µl Sample Buffer versehen und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Für die Elektrophorese wurden die Gele in ein Gelkammersystem (Mini-Protean®, BioRad) eingespannt, das daraufhin mit Laufpuffer gefüllt wurde. Zusätzlich zu den Proben wurde auch ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (Roti®-Mark, Carl Roth GmbH & Co.KG) aufgetragen. Der Marker enthielt folgende Proteine mit der jeweiligen definierten Größe: Myosin vom Rind (245 kDa), β-Galactosidase vom E.coli (123 kDa), Serumalbumin vom Rind (95 kDa), Ovalbumin vom Huhn (50 kDa), Carboanhydrase (33 kDa), Trypsin Inhibitor aus Soja (23 kDa), Lysozym vom Huhn (17 kDa). Die Elektrophorese wurde mit 150 V und 12 mA pro Gel für 30 Minuten begonnen. In dieser Zeit durchliefen die Proben das Sammelgel

vollständig. Danach wurde auf 150 V und 24 mA pro Gel für 60 Minuten gewechselt. In dieser Zeit durchwanderten die Proben auch das Trenngel.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Laufpuffers (pH 8,3)

Inhaltsstoff	Konzentration/ Menge
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,10%

3.6.1 Färbung mit Coomassie Blue

Nach der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Gele als erstes kurz mit TTBS (TBS in einer 1:10 Verdünnung mit 0,1% Tween) gewaschen und daraufhin für mind. 4 Stunden mit Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution (BioRad) angefärbt. Nach der Anfärbung erfolgte ein Waschen der Gele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Destain Solution (BioRad) für nochmals 45 Minuten.

3.6.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde nach Herstellerangaben wie folgt durchgeführt.

Nach der SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurden die Gele zwei Mal für fünf Minuten mit hochreinem Wasser gewaschen. Danach kamen die Gele über Nacht in eine Fixierlösung bestehend aus 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure. Am nächsten Tag wurden die Gele zuerst zweimal für 5 Minuten mit 10 % Ethanol behandelt, danach zwei Mal für fünf Minuten mit ultrareinem Wasser. Im nächsten Schritt wurden die Gele für eine Minute in eine Sensitizer Lösung (Silver Stain Sensitizer, Thermo Fisher Scientific) eingelegt. Nach diesem Schritt wurden die Gele erneut für zwei Mal eine Minute mit ultrareinem Wasser gewaschen. Jetzt waren die Gele für die Anfärbung mit der Färbelösung bestehend aus 500 µl *Enhancer* (Silver Stain Enhancer, Thermo Fisher Scientific) und 25 ml *Stain* (Silver Stain, Thermo Fisher

Scientific) vorbereitet. Nach 30 Minuten Färbung wurden die Gele zwei Mal für 20 Sekunden mit ultrareinem Wasser gewaschen und danach für zwei Minuten mit dem *Developer* (Silver Stain Developer, Thermo Fisher Scientific) behandelt. Diese Reaktion wurde durch 5 % Essigsäure gestoppt.

3.6.3 Auswertung der Gele

Alle Gele wurden direkt nach der jeweiligen Färbung mit Hilfe des Bio-Image Systems (ChemoBis, Biostep®) fotografiert und anschließend konserviert. Für die Konservierung wurden die Gele mit 2 % Glycerin behandelt und anschließend in Zellulose (Roth) getrocknet. Mit Hilfe der TotalLab Software (Nonlinear Dynamics) wurden die Fotografien hinsichtlich der dargestellten Molekulargewichte ausgewertet.

3.7 RPE-Zellkultur

Die Augen frisch geschlachteter Schweine dienten zur Gewinnung der RPE-Zellkultur. Hierzu wurden die Augen kurz nach E nukleation von der äußeren Augenmuskulatur und anderem überschüssigem Gewebe befreit. Anschließend erfolgte zunächst die 3 minütige Inkubation in Betaisodona-Lösung (Betaisodona 1:3 in Natriumchlorid) mit darauf folgender Überführung in 4 °C kalte sterile Natriumchloridlösung. Im nächsten Schritt wurden der vordere Augenabschnitt mit Glaskörper und Linse entfernt. Unter Einwirkung von warmer phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) konnte die Retina abpräpariert werden. Die Zellen wurden daraufhin für 5 Minuten bei 37 °C mit Trypsin behandelt. Im Anschluss wurde das Trypsin gegen Trypsin-EDTA getauscht und die Zellen bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der 45 Minuten konnten die Zellen von der Bruch'schen Membran gespült, in ein Zellkulturmedium überführt werden und zweimal bei 900 U/min für 5 Minuten zentrifugiert werden. Nachfolgend wurden die Zellen in ein Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen bei einem Luftgemisch mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % bei 37 °C angezogen. Das Zellkulturmedium bestand sich aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat (HEPES), 1 % Penicillin/Streptomycin, Natrium-Pyruvat und 10 % fötalen Kälberserum (*fetal calf serum (FCS)*). Alle 3 Tage wurden das Zellkulturmedium gewechselt.

Zur Vermehrung der RPE-Zellen wurden die Zellen zunächst mit warmer PBS-Lösung gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C in Trypsin-EDTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den Zellkulturschalen gelöst, in frisches Zellkulturmedium überführt und bei 900 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Aussaat der Zellen mit 3 ml Zellkulturmedium in neue Zellkulturschalen. Die RPE-Zellen wurden in den Generation P0 bis F3 angezogen. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie und -intaktheit.

3.8 Anti-VEGF-Effektivität von Bevacizumab

Um die Anti-VEGF-Effektivität von Bevacizumab zusammen mit rtPA und Plasmin aus geronnenem humanen Vollblut zu quantifizieren, wurde ein *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Quantikine, R&D Systems) verwendet. Hierzu wurde Medium von konfluierenden porcinen RPE-Zellen gesammelt, da diese Zellen eine signifikante Menge an VEGF in das Medium sezernieren (Klettner et al., 2008).

Hierfür wurden alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank (Antair BS, A. Sternkopf GmbH, Lübeck) durchgeführt. Um einen in etwa gleich hohen Anteil an VEGF in den Medien zu erhalten, wurden die RPE-Zellen im Brutschrank (Brutschrank, Labotect, Göttingen) bei 37 °C und 5 % CO₂ für vier Stunden mit je 3 ml frischem Nährmedium versorgt. Zuvor wurde das alte Nährmedium mit Hilfe einer Saugpumpe (Vacusafe comfort, Integra Biosciences AG) abgesaugt. Jeweils 500 µl dieses Nährmediums wurden mit einem 20 µl Gemisch aus Bevacizumab und rtPA, einem 20 µl Gemisch aus Bevacizumab und Plasmin und 20 µl Überstand, aus dem Gemisch Bevacizumab, rtPA und Blut, versetzt. Die Proben wurden daraufhin für 5 Minuten bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend wurde jeweils 500 µl Überstand abgenommen und bis zur Durchführung des ELISAs eingefroren.

3.8.1 Gewinnung der Blutproben

Im Vorfeld wurde um das Blut-Gemisch herzustellen, einem gesunden Probanden Blut abgenommen. Jeweils 10 Tropfen dieses Blutes wurden in Eppendorf Röhrchen gefüllt und für 15 Minuten unverschlossen bei Raumtemperatur bis zur vollständig abgeschlossen Gerinnung stehen gelassen. Bevacizumab und rtPA wurden in den gleichen Mengen und

Konzentration dem geronnenen Blut hinzugefügt, wie sie auch intraoperativ eingesetzt werden (rtPA 50 µl/10 µg; Bevacizumab 50 µl/1,25 mg). Dieses Gemisch wurde nun bei 37 °C 30 Minuten inkubiert und anschließend für eine Minute zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde, wie oben beschrieben, mit dem Nährmedium vermengt.

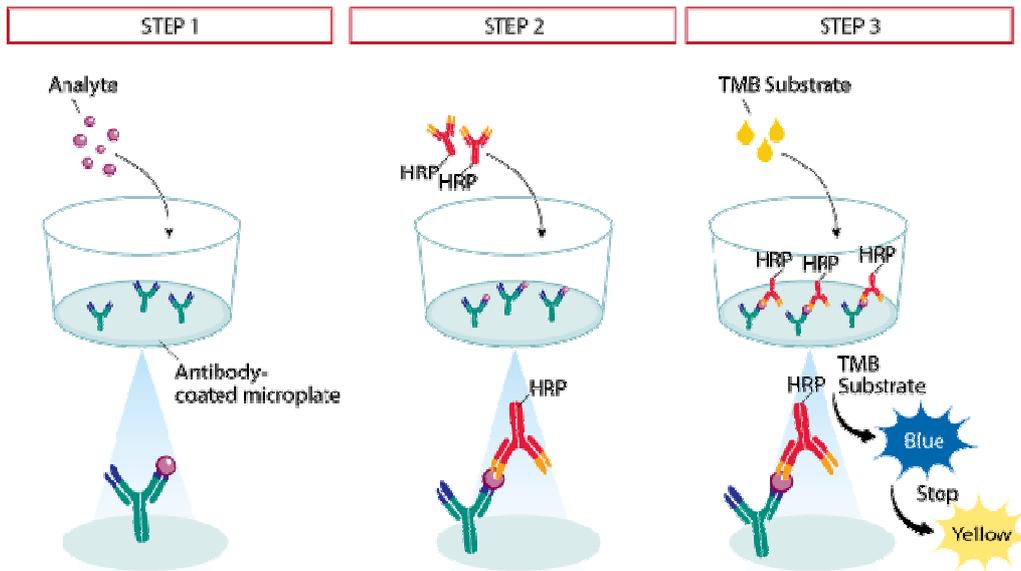
Die Proben wurden daraufhin für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnenen Überstände stellten die verwendeten Proben für den VEGF ELISA da, der wie unten aufgeführt und nach der Benutzeranweisung des Herstellers ausgeführt wurde. Die Proben wurden bis zur Analyse mit ELISA eingefroren.

3.8.2 VEGF-ELISA

Testprinzip

Der „*Enzyme linked immunosorbent Assay*“ (ELISA) ist eine häufige verwendete Methode um Proteine sowohl nachzuweisen als auch zu quantifizieren. Bei einem sogenannten „*Sandwich-ELISA*“ wird die Probe in eine Vertiefung auf einer speziellen Mikrotiterplatte aufgetragen. In dieser Vertiefung (Well) befindet sich ein sogenannter Fang (*capture*)-Antikörper oder auch Primärantikörper. Dieser Antikörper bindet unspezifisch mit dem Boden der Mikrotiterplatte und spezifisch mit der zugegebenen Probe. Im nächsten Schritt wird ein Sekundärantikörper, ein sogenannter „*Detektions (detection)*- Antikörper, hinzugegeben. Dieser bindet den Antigen-Antikörper-Komplex aus Primärantikörper und Probe und es entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch Zugabe eines passenden chromogenen Substrates wandelt das Reporterenzym des Detektionsantikörper dieses Substrat zu einem Reaktionsprodukt um, welches durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemoluminiszenz nachgewiesen werden kann.

Der Quantikine® Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, USA), der in dieser Arbeit verwendet wurde, detektiert porcine VEGF₁₆₅-Konzentrationen in Zellkulturmedien, Plasma und Serum. Alle verwendeten Substanzen stammen vom selben Hersteller wie der ELISA Kit und gehörten derselben Charge an.



Schritt 1: Auftragen der Probe auf den Fang (capture)-Antikörper

Schritt 2: Austragen des enzymtragenden Detektions-Antikörper (HRP)

Schritt 3: Zugabe des Substrates (TMB Substrate) für den Detektions-Antikörper mit nachfolgendem Farbumschlag

Abbildung 2: Schematische Darstellung des VEGF- ELISA

aus: *R&D Systems, ELISA Reference Guide & Catalog, Minneapolis, USA, 2012*

3.8.3 Durchführung des VEGF-ELISA

Um den VEGF-Gehalt einer Probe bestimmen zu können, wird bei jedem ELISA eine Standard-VEGF Verdünnungsreihe benötigt, deren VEGF Gehalt bekannt ist. Aus diesem Grund wurden der vom Hersteller mitgelieferte VEGF-Standard gelöst, auf einen VEGF₁₆₅-Gehalt von 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62,5 pg/ml verdünnt und zusammen mit den restlichen Proben aufgetragen.

Tabelle 5: Platten, Lösungen und Puffer für Sandwich-ELISA

Platte	96 well polystyrene Mikrotiterplatte beschichtet mit Fangantikörper
VEGF Standard	2000 pg rekombinantes humanes VEGF ₁₆₅
VEGF Conjugate	Detektionsantikörper
Assay Diluent RD1W	
Calibrator Diluent RD5K	
Wash Buffer Concentrate	25 fach konzentrierte Waschpufferlösung
Color Reagent A	12,5 ml stabilisiertes Wasserstoffperoxid
Color Reagent B	12,5 ml stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidine)
Stop Solution	6 ml 2N Schwefelsäure

Vor dem Auftragen der Proben wurde diese aufgetaut, auf Raumtemperatur gebracht und durch wiederholtes auf- und abpipettieren vermengt. In jedes *well* wurde nun 50 µl RD1W und jeweils 200 µl der Proben gegeben. RD1W aktivierte den ELISA. Sowohl die Proben als auch die Standardverdünnungsreihe wurden doppelt aufgetragen. Zum Schutz vor Kontamination von außen wurde die Mikrotiterplatte nun mit Einweg-Klebestreifen verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. In dieser Zeit kam es zu Antigen-Antikörperbindung zwischen den in der Probe enthaltenen Proteinen und dem Primäantikörper. Im nächsten Schritt wurden die *wells* mit ihrem Inhalt dreimal maschinell mit einem *wash buffer* gewaschen (ELx50 Washer, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Nach dem Waschen wurden jeweils 200 µl VEGF *conjugate*, welches den Sekundäantikörper enthielt, in die *wells* pipettiert. Im nächsten Schritt wiederholte sich das oben beschriebene Vorgehen aus Abkleben, zwei Stunden stehen lassen und drei maligem maschinell Waschen. Jetzt erfolgte die Zugabe von je 200 µl *Color Reagent* in die *wells*. Das *color reagent* entsprach dem Substrat der an den Sekundäantikörper gekoppelten Merrettichperoxidase. Die Mikrotiterplatte wurde nun für 20 Minuten unter einer

lichtdurchlässigen Aluminiumfolie aufbewahrt. In dieser Zeit bildete sich in den Wells ein gelblicher Farbumschlag. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Aluminiumfolie entfernt und es erfolgte die Zugabe von jeweils 50 μ l stop solution. Als Zeichen für eine erfolgreich beendete enzymatische Reaktion auf Grund der Zugabe der *stop solution* erfolgte ein Farbumschlag vom Gelblichen ins Bläuliche.

3.8.4 Messung des VEGF-ELISA

Der Farbumschlag wurde photometrisch bei $\lambda=450$ nm gegen einen Leerwert aus 200 μ l RD5K gemessen (ELx800 Reader, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) gemessen.

3.9 Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen und der Volumen der SMB wurden die Mittelwerte der Ergebnisse und die zugehörigen Standardabweichungen berechnet.

Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Volumen der SMB

Die Fläche der 12 ausgewerteten SMB umfasste einen Bereich von 7,85 - 51,61 mm². Für die Höhe wurden Werte zwischen 0,39 und 1,16 mm gemessen. Daraus ergab sich ein berechnetes Volumen der SMB zwischen 6,19 mm³ und 94,64 mm³. Der Mittelwert lag bei 28,63 mm³, die Standardabweichung betrug 24,66 mm³.

Beim Vergleich der Papillendurchmesser zur Blutungsfläche erhielt man Werte zwischen 2,42 und 21,2 (Papillendurchmesser/ Blutungsfläche). Daraus ergab sich ein Mittelwert von 9,1 Papillendurchmesser/Blutungsfläche. Die Standardabweichung betrug 5,38.

4.2 SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Alle Versuche wurden mindestens drei Mal ausgeführt. Zu jeder Versuchsreihe ist im Folgenden ein exemplarisches Gel abgebildet sowie eine Tabelle mit den mittleren Bandenwerten (Molekulargewicht in kDa). Die weiteren Abbildungen der einzelnen Gele ebenso wie die dazugehörigen Tabellen der einzelnen Bandenwerte (Molekulargewichte in kDa) sind im Anhang (ab S. 60) dieser Arbeit aufgeführt.

4.2.1 rtPA und Bevacizumab

4.2.1.1 Färbung nach Coomassie

In der Färbung nach Coomassie zeigten sich in der Versuchsreihe der 1:10 Verdünnungen in allen Gelen in ihrem Molekulargewicht nahezu identische Banden. In dem Gemisch aus Bevacizumab und rtPA ließen sich einzelne Bevacizumab Banden bei einem mittleren Molekulargewicht von 35,3 kDa und 20,5 kDa nicht darstellen. Außerdem kam es zum Teil zu Bandenmustern, die eine sichere Zuordnung zu Bevacizumab oder rtPA nicht zuließen.

In der Versuchsreihe der 1:100 Verdünnungen zeigten die Gele, bezogen auf Bevacizumab und das Gemisch aus Bevacizumab und rtPA, sehr ähnliche Bandenmuster. Bei den rtPA Proben konnte nur auf einem Gel eine Bande mit einem Molekulargewicht von 76,19 kDa zur Darstellung gebracht werden. Insgesamt zeigten sich in dieser Verdünnung deutlich weniger

Banden als in der 1:10 Verdünnung. Im Gemisch aus Bevacizumab und rtPA konnte weder die eine rtPA Bande noch ein Großteil der Bevacizumab Banden dargestellt werden. Abbildung 3 zeigt im Folgenden ein exemplarisches Gel und Tabelle 6 zeigt zusammenfassend die entsprechenden Mittelwerte der Bandenmuster.

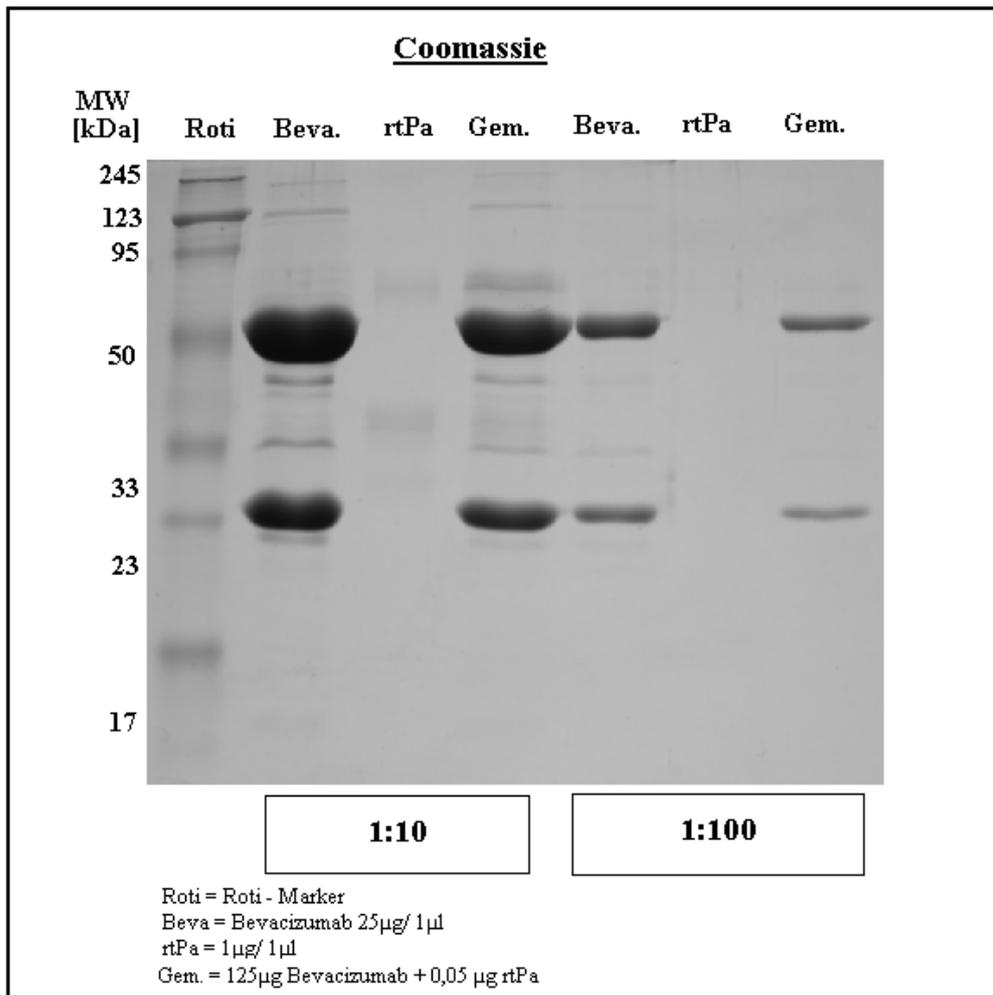


Abbildung 3: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDA“).

Tabelle 6: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung (Molekulargewicht in kDa)

Beva. 1:10	rtPA 1:10	Gem. 1:10	Beva. 1:100	rtPA 1:100	Gem. 1:100
230,1		249	282		
135,1		144,6	154,6		
	71,9	74,4		76,19	
47	57,1	48,9	53,4		57,4
39,8		40,3	39,9		
37,8	35,1	35,3			
33,7		33,3	32,8		
23,7		23,7	24,5		
18,8		20,5			25,4

4.2.1.2 Silberfärbung

In der Silberfärbung konnten in allen Gelen im Vergleich zur Färbung nach Coomassie deutlich mehr Banden zur Darstellung gebracht werden. In der 1:10 Verdünnung gab es bei Bevacizumab in einem Gel eine Bande mit einem besonders hohem Molekulargewicht von 394,7 kDa. Die restlichen Gele zeigten sehr ähnliche Bandenmuster. Im Gemisch aus Bevacizumab und rtPA konnten nicht in jedem Gel alle rtPA Banden dargestellt werden. Außerdem ließen sich einzelne Banden nicht klar Bevacizumab oder rtPA zuordnen. In einem Gel traten im Gemisch im Vergleich zu der Bevacizumab und rtPA Probe zwei zusätzliche Banden auf, die jedoch als sehr schmale und nur schwach angefärbt, zur Darstellung kamen.

In der 1:100 Verdünnung konnten im Vergleich zur 1:10 Verdünnung deutlich weniger Banden angefärbt werden. Die Bandenmuster der einzelnen Gele waren auch hier sehr ähnlich. Im Gemisch aus Bevacizumab und rtPA traten in allen Gelen keine zusätzlichen Banden auf. Einzelne rtPA Banden ebenso wie einzelne Bevacizumab Banden fehlten im Gemisch. Weiterhin ließen sich einzelne Banden nicht klar Bevacizumab oder rtPA zuordnen. Nachfolgend zeigt Abbildung 4 ein exemplarisches Gel und Tabelle 7 stellt den Bandenmustern entsprechende Mittelwerte dar.

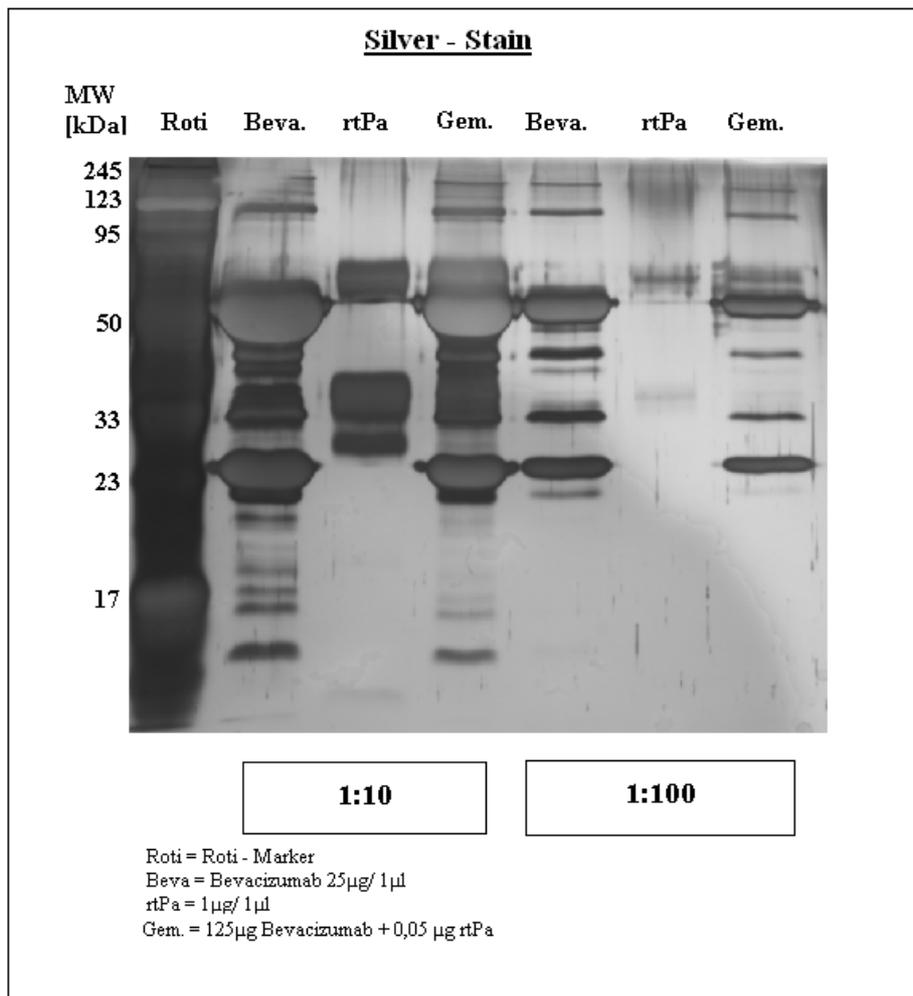


Abbildung 4: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angegeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDA“).

Tabelle 7: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva.“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung (Molekulargewicht in kDa)

Beva. 1:10	rtPA 1:10	Gem. 1:10	Beva. 1:100	rtPA 1:100	Gem. 1:100
394,7		389,2			
217,7		215,1	218,1		185,25
161,6		155,6			
119,6		106,9	108,3		103,7
	69,8	66,9		68,2	67,1
53	52,5	52,2	56,9	57,1	57,3
43,7		45,1	46		49,1
		42,1	42,2		44,1
38,9	38,8	38,5	39,1		39,5
36,7	35,6	36,6			38,3
34,7		35,1		34,9	
32,7	32,9	33,1	33,4		33,8
26,2	26,4	25,9	25,7		26,3
19,6		21,6	20,1		
18,4		19,1			
17,3		17,1			
16,6		16,45			
16,1		15,7	15,8		16,9
14,1		13,9	13,8		
	12,1				

4.2.2 Bevacizumab und Plasmin

4.2.2.1 Färbung nach Coomassie

In der Färbung nach Coomassie zeigten sich in der 1:10 Verdünnung bei Bevacizumab, Plasmin und den beiden Gemischen aus Bevacizumab und Plasmin in ihrem Molekulargewicht sehr ähnliche Bandenmuster. In beiden Gemischen konnten keine Plasmin Banden dargestellt werden. Es fehlten auch einzelne Bevacizumab Banden im Vergleich zur Bevacizumab Probe. Zusätzliche Banden traten in den Gemischen nicht auf.

In der 1:100 Verdünnung zeigten alle Gele ein nahezu identisches Bandenmuster. Lediglich bei der Plasmin-Probe konnte nur in einem Gel eine Bande bei 79,8 kDa nachgewiesen werden. Die beiden Gemische aus Bevacizumab und Plasmin zeigten keine Plasmin Banden. Auch ein Großteil der Bevacizumab Banden konnte nicht dargestellt werden. Abbildung 5

zeigt im Folgenden ein exemplarisches Gel und Tabelle 8 zeigt zusammenfassend die entsprechenden Mittelwerte der Bandenmuster.

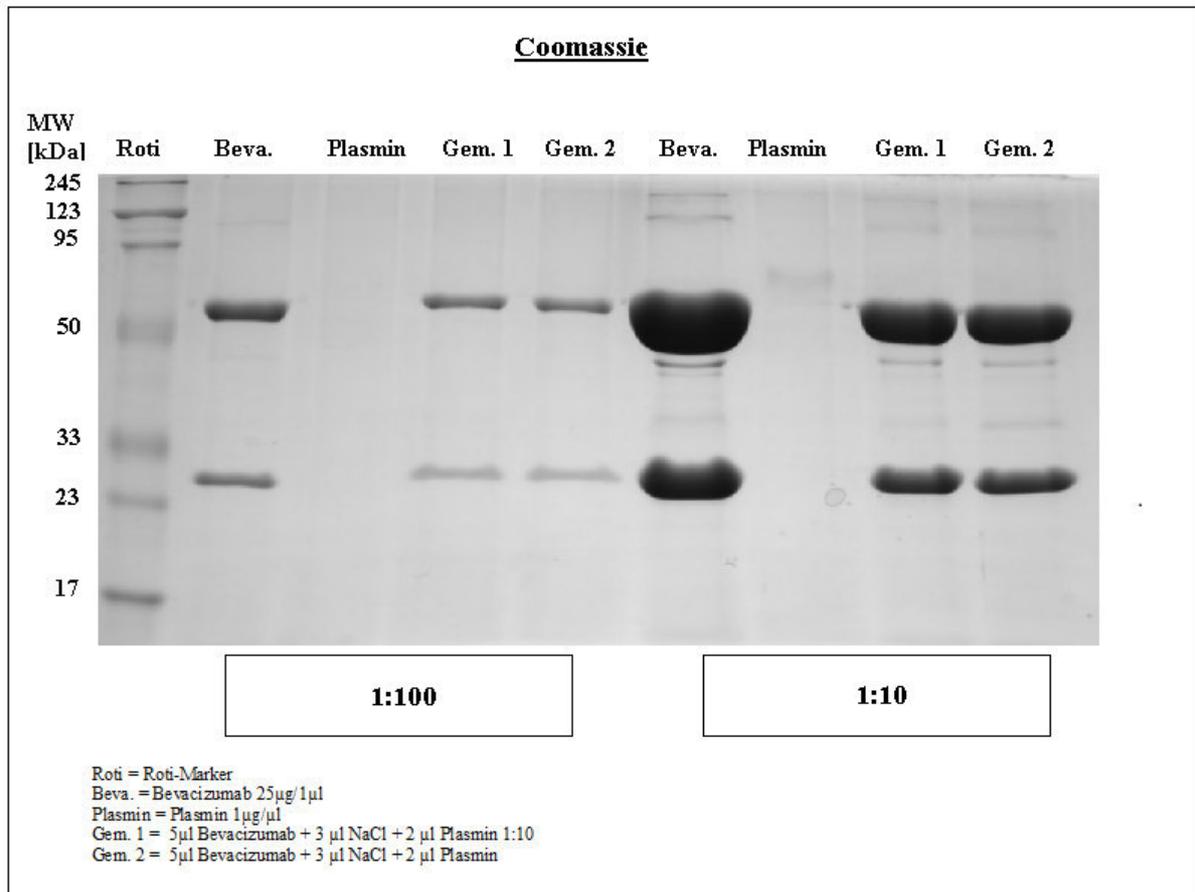


Abbildung 5: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDA“).

Tabelle 8: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Coomassie Färbung (Molekulargewicht in kDa)

Beva. 1:10	Plasmin 1:10	Gem. 1 1:10	Gem. 2 1:10	Beva. 1:100	Plasmin 1:100	Gem. 1 1:100	Gem. 2 1:100
182,4		163,3	170,4	124			
109,3		108,4	113,4				
	80,3			73,7	79,8		
	65,6						
		54	52,8			55,2	54,3
46,9	45,9	42,9	42,1	41,7			
37,7		38,3	38,1				
36,1		35,2	35,1				
32,7		32,7	32,7				
		29,4	26	29,2		26,9	26,5
25,5		25,4	24,7	25,4			
20,2		20,6		22,1			
14,2		13,8	13,6				

4.2.2.2 Silberfärbung

In der Silberfärbung von Bevacizumab, Plasmin und den beiden Gemischen aus Bevacizumab und Plasmin in der 1:10 Verdünnung zeigten alle Gele sehr ähnlich Bandenmuster. Auch sind in allen Gelen deutlich mehr Banden zu sehen als in den Gelen der Färbung nach Coomassie. In den Gemischen ließen sich einige Banden nicht sicher Bevacizumab oder Plasmin zu ordnen. Es fehlten insbesondere im Gemisch 1 einige Plasmin Banden. Beide Gemische zeigten im Vergleich zu Plasmin und Bevacizumab alleine keine zusätzlichen Banden.

In der 1:100 Verdünnung zeigten alle Gele ähnliche Bandenmuster. Jedoch ließen sich nur in einem Gel Plasmin Banden mit einem Molekulargewicht von 58 kDa und 71,6 kDa zur Darstellung bringen. Die Gemische aus Plasmin und Bevacizumab zeigten nur in einem Gel eine Plasmin Bande mit einem Molekulargewicht von 58,4 kDa. Zum Teil fehlten auch einzelne Bevacizumab Banden und einzelne Banden konnten nicht eindeutig Bevacizumab oder Plasmin zu geordnet werden. Es traten in keinem Gemisch zusätzliche Banden im Vergleich zu Bevacizumab und Plasmin alleine auf. Nachfolgend zeigt Abbildung 6 ein exemplarisches Gel und Tabelle 9 stellt den Bandenmustern entsprechende Mittelwerte dar.



Abbildung 6: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDA“).

Tabelle 9: Mittelwerte der Bandenmuster von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Beva. 1:10	Plasmin 1:10	Gem. 1 1:10	Gem. 2 1:10	Beva. 1:100	Plasmin 1:100	Gem. 1 1:100	Gem. 2 1:100
226,2		195,5		194,5		154	154,4
133,1		111,5	150,1				
	86,4		84,9				
	78,8				71,6		
60,2	63,1	64,5		62,3			
	56,6				58	53,8	53,1
	46,9		44,4	48,2			
40,8	41,9	39,5	39,2	41,5		41,5	41
37,7		38		38,7		37,4	37,3
35,2		35,3	36,3				
33,4		33,4	33,9	34			
32,5		32,4	32,4				
31,1		30,6	30,4	30,8		31,8	31,8
30,1		29,7	29,6	27,3		28,3	28,3
27,9	27,5	27,9	27,9				
26,6		26,7	27	24,5		25,9	25,9
21,6		20,9	21,9			22,1	22,1
20		19,8	19,8				
18,7		18,5	19	18,6		18,1	18,1
			18,3				
16,5	15,7	16,2	15,8				
13,7		13,6	13,2	13,2			

4.3 VEGF-ELISA

Im VEGF-ELISA zeigte sich, dass in dem Nährmedium aus konfluierenden porcinen RPE-Zellen eine signifikante Menge an VEGF gemessen werden konnte. Der Mittelwert der VEGF-Konzentration betrug 1408 pg/ml. Die Standardabweichung lag bei 195,8 pg/ml. In keinem Experiment in dem Bevacizumab (250 µg/ 20 µl) dem Nährmedium (500 µl) hinzugefügt wurde, konnte VEGF im ELISA nachgewiesen werden. Jeder Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

4.3.1 Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA

Auch nach dem das Gemisch aus rtPA und Bevacizumab, das zuvor für 2 Stunden bei 37°C inkubiert wurde, dem Nährmedium hinzugeführt wurde, konnte im ELISA kein VEGF nachgewiesen werden. Der Mittelwert der VEGF-Konzentration in dem Gemisch aus Bevacizumab und rtPA betrug 1 pg/ml. Die Standardabweichung lag bei 1,7 pg/ml. Hingegen konnte in den rtPA-Proben eine ähnliche hohe VEGF-Konzentration wie in der Kontrollgruppe gezeigt werden. Hier lag der Mittelwert bei 1345,3 pg/ml im Vergleich zu 1318,3 pg/ml in der Kontrollgruppe. Die Standardabweichung der rtPA-Proben betrug 194,7 pg/ml. Die Standardabweichung der Kontrollproben lag bei 207,5 pg/ml. In den Bevacizumab-Proben wurden ähnliche Werte wie in den Proben bestehend aus rtPA und Bevacizumab gemessen. Der Mittelwert der VEGF-Konzentration in den Bevacizumab-Proben betrug 2,7 pg/ml. Die Standardabweichung lag bei 2,5 pg/ml. Somit konnte nachgewiesen werden, dass das Gemisch von Bevacizumab und rtPA in den klinisch üblichen Konzentrationen keinen Funktionsverlust des Bevacizumab bedingt (siehe Abb. 7).

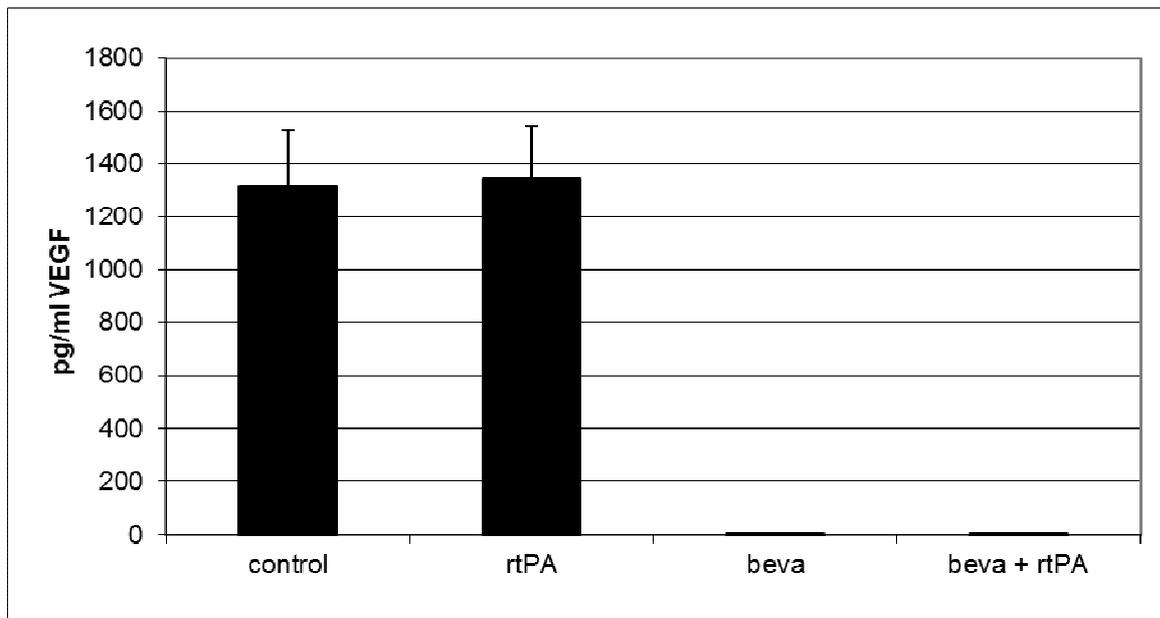


Abbildung 7: VEGF-Sekretion nach Zugabe von rtPA, Bevacizumab („Beva.“) oder dem Gemisch aus Bevacizumab und rtPA. Angegeben ist die VEGF-Konzentration in pg/ml.

4.3.2 Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA und Plasmin aus humanem Vollblut

Bei Ko-Applikation von Bevacizumab und rtPA mit humanem Vollblut zeigten sich im ELISA ähnliche VEGF-Konzentrationen wie unter alleiniger Applikation von Bevacizumab oder Bevacizumab in Ko-Applikation mit Blut. Der Mittelwert der VEGF-Konzentration des Gemisches, bestehend aus Bevacizumab, rtPA und humanem Vollblut, betrug 10,3 pg/ml. Die Standardabweichung lag bei 11,8 pg/ml. Der Mittelwert des Gemisches Bevacizumab und humanes Vollblut betrug 11,3 pg/ml und die Standardabweichung lag hier bei 11,1 pg/ml.

Die Proben des Gemisches aus rtPA und humanem Vollblut zeigten einen Mittelwert der VEGF-Konzentration von 1546 pg/ml mit einer Standardabweichung von 57,3 pg/ml. Diese Werte entsprechen denen der Kontroll-Proben. Hier lag der Mittelwert der VEGF-Konzentration bei 1497,7 pg/ml und die Standardabweichung bei 134,2 pg/ml (siehe Abb. 8).

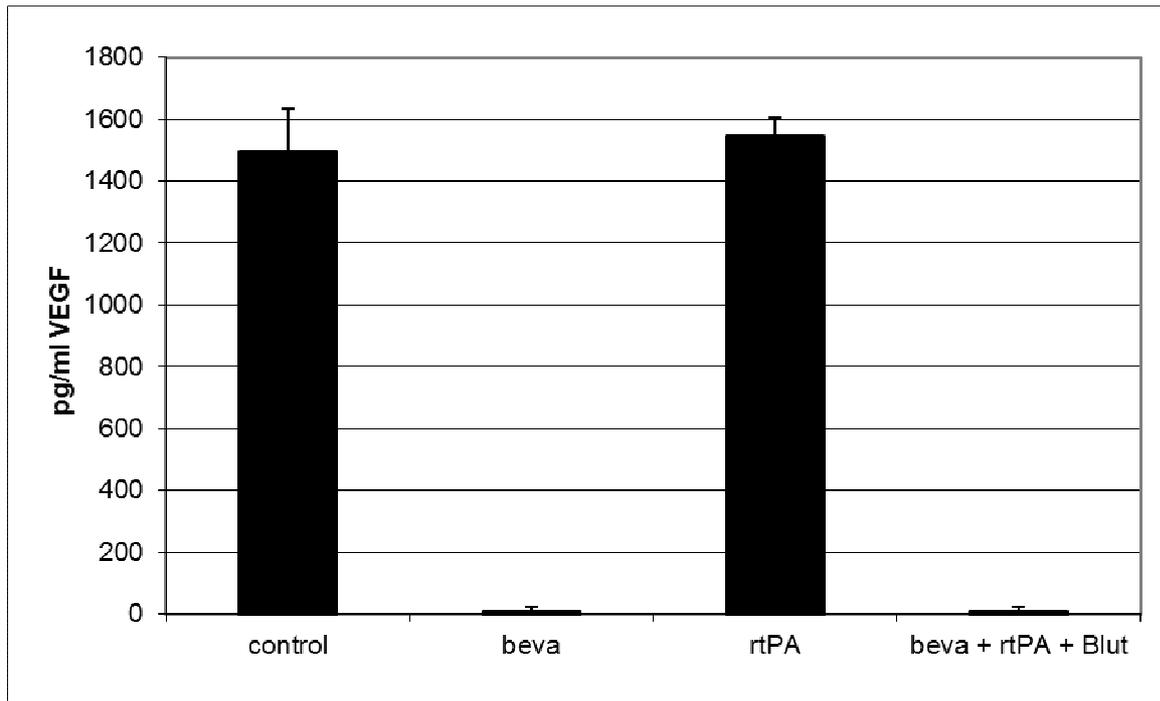


Abbildung 8: VEGF-Sekretion nach Zugabe von Bevacizumab („Beva.“), rtPA oder dem Gemisch aus Bevacizumab, rtPA und humanem Vollblut („Blut“). Angegeben ist die VEGF-Konzentration in pg/ml.

5 Diskussion

5.1 In-vitro Modell der SMB

Zur Etablierung eines in-vitro Modells der submakulären Blutung wurden zunächst die verschiedenen Volumina des SMB mittels Fundus, OCT und/oder Spectralis HRA + OCT Bildern berechnet. Die Größe der einzelnen SMB zeigte bei einem relativ kleinem Patientenkollektiv von zwölf Patienten eine große Spannweite (Volumen der SMB: 6,19 mm³ - 94,64 mm³). In dem hier etablierten in-vitro Modell der SMB wurde auf Grund der großen Spannweite der SMB ein deutlich größeres Blutvolumen bei gleichbleibender Medikamentendosierung verwendet. Die Möglichkeit, dass auf Grund eines zu geringen Blutvolumens und der damit verbundenen möglichen zu niedrigen Konzentration an bislang nicht identifizierten Proteasen, nur ein Teil der Bevacizumab-Antikörper gespalten oder funktionell inaktiviert werden könnten, wurden somit ausgeschlossen.

5.2 Strukturelle Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin

Zur Untersuchung der strukturellen Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin wurde die SDS-PAGE-Gelelektrophorese genutzt. rtPA entspricht dem körpereigenen tPA und stellt damit eine Fibrin spezifische Serinprotease dar. Plasmin ist ebenfalls eine Serinprotease, die aus Plasminogen gebildet wird. Es sollte die theoretische Möglichkeit, dass Bevacizumab von Plasmin oder rtPA als Proteasen gespalten wird, ausgeschlossen werden. Zusätzlich zur Färbung nach Coomassie wurde zur Auswertung der Gelelektrophorese auch eine Silberfärbung verwendet. Mit der Silberfärbung sollte das Ergebnis der Coomassie-Färbung mit einer zweiten Nachweismethode überprüft werden. Außerdem hat die Silberfärbung eine deutliche höhere Sensitivität gegenüber der Coomassie-Färbung, so dass mehr Banden zur Darstellung gebracht werden konnten. Das Bandenmuster zeigte bei beiden Färbemethoden eindeutig, dass die Koapplikation von Bevacizumab mit rtPA oder Plasmin im Vergleich zu den jeweiligen Substanzen alleine keine zusätzlichen Banden hervorbringt. Einzig in einem Gel traten im Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung zwei zusätzliche Banden auf. Diese zusätzlichen Banden sind am ehesten als Artefakt zu werten, da sie nur sehr dünn und schwach angefärbt zur Darstellung gebracht wurden. Einzelne Banden konnten bei der Ko-Applikation nicht

dargestellt werden, was am ehestens auf die höhere Verdünnung der Proteine im Gemisch zurück zu führen ist. Insgesamt konnte bei der SDS-PAGE-Gelelektrophorese gezeigt werden, dass Bevacizumab in der Ko-Applikation strukturell intakt bleibt.

Für die Gelelektrophorese wurden 12 % Gele benutzt, da diese Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 - 70 kDa optimal darstellen und in den Versuchen auch in diesem Bereich die meisten Banden zur Darstellung kamen. Allerdings sind die 12 % Gele nicht besonders gut geeignet für Proteine mit mehr als 150 kDa Molekulargewicht (Hubert Rehm, 2006). Dies erklärt im Bereich der höheren Molekulargewichte die unterschiedlichen Bandenmuster zwischen Bevacizumab alleine und den Gemischen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Ergebnissen von Faure et al. (2011), der ebenfalls mittels Gelelektrophorese nachwies, dass Bevacizumab in Koapplikation mit rtPA intakt blieb, überein. Dennoch liefert die vorliegende Arbeit wichtige neue Erkenntnisse. Zum Einen wurde gezeigt, dass nicht nur rtPA, sondern auch Plasmin Bevacizumab nicht spaltet. Zum Anderen wurde zusätzlich zur Coomassie Färbemethode auch die deutlich sensitivere Silber-Färbung genutzt, um mögliche zusätzliche Banden darstellen zu können, die mit der Coomassie-Färbung übersehen werden könnten.

Bei der SDS-PAGE- Gelelektrophorese werden Substanzen wie Bevacizumab durch Aufbrechen der Disulfidbrücken in einzelne Fragmente gespaltet. Das SDS als anionisches Detergenz sorgt hierbei für eine negative Ladung der Fragmente proportional zu ihrem Molekulargewicht. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes werden die einzelnen Fragmente entsprechend ihrer negativen Ladung, also ihres Molekulargewichtes, nach aufgetrennt.

Würden nun die vom rtPA oder von Plasmin gespaltenen Fragmente des Bevacizumabs zufällig das gleiche Molekulargewicht haben, wie die durch die Gelelektrophorese entstandenen Fragmente, könnte man diese nicht voneinander unterscheiden. Andererseits könnten auch gespaltene Bevacizumab-Fragmente noch funktionell intakt sein, wenn die VEGF-Bindungsstelle nicht betroffen wäre. Um daher sicher die Funktionalität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA zu untersuchen, wurde zusätzlich zur Gelelektrophorese noch ein VEGF-ELISA zur Quantifizierung der VEGF Bindung durch Bevacizumab bei Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin in humanem Vollblut durchgeführt.

Die Versuchsreihe Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA und humanem Vollblut wurde ausschließlich mittels VEGF-ELISA durchgeführt. Die Gelelektrophorese könnte zwar

mögliche zusätzliche Banden von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA und humanem Vollblut im Vergleich zur Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin aufzeigen, jedoch würde abschließend weiterhin die Frage bestehen bleiben ob diese zusätzlichen durch Vollblut entstandenen Spaltprodukte die Funktionalität von Bevacizumab herabsetzen würden. Zudem wäre die Anzahl an Banden die mit Proben aus humanem Vollblut entstehen würden so hoch, dass eine einzelne Differenzierung der Banden und ein Erkennen von Bevacizumab zugehörigen Banden unmöglich wäre. Daher wurde auf eine Versuchsreihe mit Vollblut in der Gelektrophorese verzichtet.

5.3 Funktionelle Integrität von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA oder Plasmin in humanem Vollblut in einem in-vitro Modell der submakulären Blutung

Die funktionelle Integrität von Bevacizumab könnte nicht nur durch die Ko-Applikation von rtPA oder Plasmin gestört werden, sondern auch durch den Kontakt von Bevacizumab mit humanem Blut nach subretinaler Injektion im Bereich der SMB. Es wäre möglich, dass Bevacizumab von nicht identifizierten Proteasen, die während der Fibrinolyse aktiviert werden, gespalten und funktionell inaktiviert wird. Zudem wurde in einer früheren Studie (Verheul et al., 2007) gezeigt, dass Thrombozyten in der Lage sind Bevacizumab aufzunehmen. Durch diesen Mechanismus könnte Bevacizumab in Mischung mit humanem Blut unwirksam gemacht werden. Daher sollte in dieser Arbeit ebenfalls geprüft werden, ob Bevacizumab auch in Anwesenheit von humanem Blut funktionell intakt bleibt.

Zu diesem Zweck wurde ein in-vitro Modell von kultivierten RPE-Zellen der intraoperativen Situation verwendet. Einer bestimmten Menge geronnenen Blutes, die über dem Volumen einer SMB lag, wurden sowohl rtPA als auch Bevacizumab in den intraoperativ üblichen Konzentrationen hinzugefügt. Das höhere Blutvolumen im in-vitro-Modell verglichen mit dem der SMB stellt sicher, dass es zu einer vollständigen Aufsättigung der Bevacizumab Moleküle mit eventuell vorhandenen durch Fibrinolyse entstandenen Proteasen kommt. Die Funktionalität des Bevacizumab wurde mittels VEGF-ELISA bestimmt, indem untersucht wurde ob die VEGF inhibierende Wirksamkeit von Bevacizumab in Mischung mit rtPA oder in Mischung mit rtPA und humanem Blut beeinträchtigt wird.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Bevacizumab weder durch rtPA, Plasmin oder andere unbestimmte Proteasen, die während der Fibrinolyse einer SMB entstehen, inaktiviert wird.

5.4 Klinischer Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen durch die Versuche mittels Gelelektrophorese, dass Bevacizumab weder von rtPA noch durch Plasmin gespalten wird. Außerdem konnte mit Hilfe des VEGF-ELISAs demonstriert werden, dass auch die VEGF inhibierende Wirksamkeit von Bevacizumab in Ko-Applikation mit rtPA und humanem Vollblut unbeeinträchtigt bleibt. Mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Medikamenten in diesem in-vitro-Modell der SMB wie Spaltung und/oder mögliche Einschränkung der VEGF inhibierenden Funktion von Bevacizumab konnten nicht dargestellt werden. Dieses in-vitro-Modell der SMB unterstützt somit das Therapiekonzept der Ko-Applikation von rtPA und Bevacizumab zur Behandlung der SMB bei AMD.

Jedoch muss im klinischen Alltag beachtet werden, dass sich das Spektrum der unerwünschten Wirkungen der einzelnen Medikamente summieren könnte. rtPA kann als Hauptnebenwirkung das Auftreten von Hämorrhagien bewirken. Auch ist es vorstellbar, dass es nach intraokulärer Gabe von rtPA zu einer systemischen Wirkung des rtPAs kommen könnte. Dies wurde jedoch in der langjährigen Anwendung von rtPA bei SMB noch nicht beschrieben. Ob eine systemische Aufnahme durch die gleichzeitige Gabe von Bevacizumab begünstigt wird, wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Für Bevacizumab hingegen konnte gezeigt werden, dass es nach intraokulärer Gabe zu einem systemischen Abfall der VEGF Konzentration kam. Auch das Auftreten unerwünschter systemischer Wirkungen wie Apoplex oder Myokardinfarkt konnte vereinzelt beobachtet werden (Fachinformation Bevacizumab).

Die intraokulären Nebenwirkungen von rtPA belaufen sich in den bisherigen Studien auf die toxischen Effekte des rtPAs auf umliegende Strukturen. So haben Hrach et al. (2000) sowie Johnson et al. (1990) beschrieben, dass sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch bei einer intraokulär injizierten Dosis von 100 µg rtPA toxische Effekte auf die umliegenden Strukturen auftraten. Chen et al. (2007) beobachteten nach zweimaliger intravitrealer Gabe von 50 µg rtPA im Dreitagesintervall diffuse Granulationen im RPE. Johnson et al. beschrieb 1991, dass 50 µg rtPA nach subretinaler Gabe bei Kaninchen ohne toxische Effekte toleriert wurden. Der Nachweis toxischer Schädigungen der Retina durch rtPA erweist sich als schwierig, da Netzhautschädigungen sowohl durch die rtPA-Gabe als auch durch die Blutung selbst entstanden sein könnten (Hesse 2001). Durch die im klinischen Alltag gebräuchlichen Dosierungen von nur 10-20 µg rtPA bei subretinaler Gabe geht man von einer nicht toxischen Dosierung aus.

Die Nebenwirkungen von Bevacizumab nach intraokulärer Injektion beziehen sich in erster Linie auf Infektionen wie Endophthalmitis, Uveitis und Vitritis. Weiterhin konnten Retinaablösungen, Einrisse im RPE, intraokuläre Druckerhöhungen und intraokuläre Hämorrhagien wie Glaskörper-, Retina- und Bindehauteinblutungen beobachtet werden. Jede einzelne dieser Nebenwirkungen wie auch ihre Gesamtheit kann zu dauerhaften Sehbeeinträchtigungen bis hin zum völligen Verlust der Sehkraft führen.

Die gleichzeitige Applikation von rtPA und Bevacizumab könnte mit einer möglichen Addition der einzelnen unerwünschten Wirkungen einhergehen. Insbesondere könnte es zu einem vermehrten Auftreten von intraokulären Hämorrhagien und Schädigungen der Retina und dem RPE kommen.

In klinischen Studien (Treumer et al. 2010 und 2012, Schouten et al. 2009, Meyer et al. 2008) konnte gezeigt werden, dass trotz möglicher erhöhter Auftretenswahrscheinlichkeit von den im vorherigen genannten unerwünschten Wirkungen das gute Ergebnis durch eine deutliche Visusverbesserung das Risiko möglicher Nebenwirkungen aufwiegt. Eine engmaschige postoperative Überwachung ermöglicht hier ein frühzeitiges Erkennen und Behandeln möglicher unerwünschter Wirkungen. Studien in den vergangenen Jahren (Matt et al. 2010, Meyer et al. 2008, Treumer et al. 2010 und 2012) konnten zudem zeigen, dass durch die Dreier-Kombination von rtPA, VEGF-Inhibitor und Gastamponade sowohl in der akuten Behandlung der Blutung als auch durch die Therapie der zugrunde liegenden Pathologie beste Erfolge erzielt werden konnten. Guthoff et al. (2011) sehen diese Dreier-Kombination gegenüber der Kombination von rtPA und Gastamponade als deutlich überlegen an. Noch nicht befriedigend geklärt bleibt die Fragestellung ob die subretinale oder die intravitreale Gabe von rtPA und Bevacizumab zu bevorzugen ist.

Hillenkamp et al. (2010) konnten in einer kleineren Fallserie zeigen, dass die subretinale rtPA Gabe zu einer deutlichen Visusverbesserung und zu einer höheren Verdrängungsrate führt als die intravitreale Injektion. Diese retrospektive nicht randomisierte Studie umfasste 47 Patienten und einen Untersuchungszeitraum zwischen einem und drei Monaten. Große prospektive, randomisierte und kontrollierte Studien mit hohem Evidenzlevel sind zu dieser Fragestellung noch nicht erfolgt. Die Ergebnisse aus Tierversuchen von Jackson et al. (2003) und Heiduschka et al. (2007) zeigen zwar, dass Bevacizumab trotz seines hohen Molekulargewichtes durch die Netzhaut diffundieren kann, dies aber wahrscheinlich nur deutlich verlangsamt. Kamei et al. wiesen 1999 im Tierversuch nach, dass rtPA nicht durch

die gesunde Netzhaut diffundieren kann. Jedoch zeigten Takeuchi et al. bereits 1994, dass dem rtPA ähnlich große Moleküle wie Albumin durch eine pathologisch veränderte Netzhaut diffundieren können. In wie weit eine SMB eine solche Diffusion eventuell behindert, wurde noch nicht untersucht. Somit bleibt es bislang ungeklärt, ob bei intravitrealer Gabe von Bevacizumab und rtPA beide Medikamente in angemessener Zeit und der therapeutisch nötigen Konzentration sicher die SMB und die versorgenden Gefäße erreicht. Das Erreichen einer therapeutisch wirksamen Konzentration ist bei subretinaler Gabe zweifelsfrei gesichert. Jedoch geht dieses Vorgehen bei Hillenkamp et al. (2010) auch mit einer etwas höheren Komplikationsrate im Vergleich zur intravitrealen Applikation einher. Um die Komplikationsrate zu senken, wird eine strengere Patientenselektion hinsichtlich der Einnahme von Antikoagulantien vorgeschlagen. In einer von Treumer et al. 2010 durchgeführten kleineren Studie zur subretinalen Applikation von rtPA und Bevacizumab gefolgt von einer Gastamponade und den 2012 veröffentlichten Langzeitergebnissen dieser Studie, konnte bereits eine insgesamt geringe Komplikationsrate gezeigt werden. So kam es in dieser retrospektiven Studie, die 41 Augen von 40 Patienten analysiert hat, nur einmal zu einem Riss des retinalen Pigmentepithels, einmal zu einem sekundären Makulaforamen und einmal im postoperativen Verlauf zu einer rhegmatogenen Netzhautablösung. Treumer et al. kamen zu dem Schluss, dass diese geringe Komplikationsrate durch Vorsicht und vor allem Übung noch weiter zu senken wäre. Die Ergebnisse dieser Studie haben zudem gezeigt, dass sowohl kleiner als auch größere SMB in den meisten Fällen erfolgreich aus der Fovea verdrängt werden konnten. Auch Patienten mit postoperativ weiterhin eingeschränkter Sehschärfe waren mit der Behandlung zufrieden, da sich das zentrale Gesichtsfeld nach erfolgreicher Verdrängung der SMB aus der Fovea verbesserte.

Somit zeigen die bisherigen Studien eindeutig, dass die subretinale Gabe der intravitrealen Gabe hinsichtlich der Visusverbesserung überlegen ist. Die höhere Komplikationsrate der subretinalen Injektion gegenüber der intravitrealen Injektion kann durch routinierte Operateure, eine strenge Indikationsstellung und eine sorgfältige postoperative Kontrolle deutlich gesenkt werden, so dass kein Nachteil gegenüber der intravitrealen Injektion mehr besteht. Unsere Daten zeigen weiterhin, dass es bei gleichzeitiger Injektion von rtPA und Bevacizumab zu keinen Interaktionen dieser beiden Substanzen und damit zu einem eventuellen Wirkverlust kommt. Diese Ergebnisse werden von den bisherigen klinischen Studien (Matt et al. 2010, Meyer et al. 2008, Treumer et al. 2010 und 2012, Guthoff et al.,

2011) unterstützt, die eine deutliche Überlegenheit der Dreier-Kombination aus rtPA, VEGF-Inhibitor und Gastamponade gegenüber einer Zweier-Kombination aus rtPA und Gastamponade sehen.

6 Zusammenfassung

Die submakuläre Blutung (SMB) ist eine Komplikation der exsudativen altersbedingten Makuladegeneration (AMD), die mit plötzlichem Verlust der zentralen Sehfähigkeit einhergeht. Ursache der SMB ist eine Ruptur kleiner Blutgefäße innerhalb einer choroidalen Neovaskularisation (CNV), deren Auftreten durch systemische Antikoagulation wahrscheinlich begünstigt wird. Ziel der operativen Therapie ist eine frühestmögliche Verdrängung der SMB aus dem Bereich der Fovea und eine frühestmögliche antiangiogenetische Therapie der der Blutung zugrunde liegenden CNV. Klinisch wurde deshalb Bevacizumab als Off-Label-Medikament zur Behandlung der CNV mit einem Fibrinolytikum wie rtPA intraoperativ ko-appliziert. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob rtPA selbst, rtPA-generiertes Plasmin oder bei der Fibrinolyse aktivierte Proteasen in einer Ko-Applikation Bevacizumab strukturell spalten und/oder funktionell inaktivieren. Mittels einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab weder von rtPA, noch von Plasmin gespalten wird. Die Mischungsverhältnisse bei all diesen Proben entsprachen dabei den in der klinischen Anwendung üblichen Konzentrationen. Da die SDS-PAGE-Gelelektrophorese alleine nicht beweist, dass Bevacizumab in der Ko-Applikation nicht nur strukturell, sondern auch funktionell intakt bleibt, wurde zusätzlich ein VEGF-ELISA mit porcinem RPE durchgeführt. Dieser zeigte, dass Bevacizumab trotz Ko-Applikation mit rtPA seine VEGF-Bindungsfähigkeit beibehält. Um abschließend ein möglichst genaues in-vitro Modell der intraoperativen Situation zu schaffen, wurde geronnenes humanes Vollblut mit rtPA und Bevacizumab gemischt. Hierfür wurde vorher mittels Fundus, Infrarot-Fundusfotografie und OCT - Bildern das durchschnittliche Volumen submakulärer Blutungen bestimmt. Mittels VEGF-ELISA konnte gezeigt werden, dass rtPA und Bevacizumab auch in Anwesenheit von geronnenem Blut ko-appliziert werden können, da die VEGF-Bindungsfähigkeit des Bevacizumabs trotz im humanem Vollblut enthaltener Enzyme wie Plasmin oder anderen nicht identifizierten Proteasen nicht beeinträchtigt wird.

Diese Arbeit zeigt in den Versuchsreihen der SDS-PAGE-Gelelektrophorese und des VEGF-ELISAs eindeutig, dass Bevacizumab sowohl strukturell als auch funktionell intakt bleibt. Proteasen wie rtPA, Plasmin oder andere nicht identifizierte Proteasen im Blut haben keine Auswirkung auf das Bevacizumab-Molekül. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen somit die der ersten klinischen Studien zur kombinierten Gabe von Bevacizumab und rtPA bei SMB

durch AMD und ermöglichen eine Ausweitung der klinischen Studien zur subretinalen Ko-Applikation von rtPA und Bevacizumab zur Behandlung der SMB bei AMD.

Anhang

Ergebnisse der SDS-Gel-Elektrophorese

Bevacizumab und rtPA

Tabelle 10: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
237,7	216,6	236,1	230,1	9,6
140,5	126,3	138,6	135,1	6,3
47,9	45,6	47,4	47	0,99
40,8	40,1	38,5	39,8	0,97
38,6	37,9	37	37,8	0,7
33,9	34	33,2	33,7	0,4
23,1	24,3	23,8	23,7	0,5
20,6	14,7	21,2	18,8	2,9

Tabelle 11: Ergebnisse von rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
68,7	71,1	75,9	71,9	3
	57,1		57,1	0
35,6	35,2	34,6	35,1	0,4

Tabelle 12: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
245	238,6	263,5	249	10,6
145,6	133,8	154,6	144,6	8,5
70,5	75,6	77,2	74,4	2,9
48,4	50	48,2	48,9	0,8
40,9	41,2	38,7	40,3	1,1
36		34,7	35,3	0,7
33,4	33,7	32,7	33,3	0,4
23	25, 1	23	23,7	0
20,3		20,7	20,5	0,2

Tabelle 13: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
		282	282	0
		154,6	154,6	0
51,5	55,6	53	53,4	1,7
40,9		38,9	39,9	1
33,1		32,4	32,8	0,35
23,8	26,1	23,6	24,5	1,1

Tabelle 14: Ergebnisse von rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
76,19			76,19	0

Tabelle 15: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
55,4	66,9	55,8	57,4	5,3
24,8	27,5	23,9	25,4	1,5

Tabelle 16: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
		394,7	394,7	0
218,7	215,7	218,6	217,7	1,4
	161,6		161,6	0
118,2	121		119,6	1,4
51,4	53,6	53,9	53	1,1
43,7			43,7	0
41,3	40,1	35,4	38,9	2,5
37,5	38,1	34,4	36,7	1,6
35,4	35,1	33,7	34,7	0,7
32,9	33,2	32,1	32,7	0,5
25,3	26	27,3	26,2	0,8
20,5	19,3	19	19,6	0,7
18,4			18,4	0
17,5	17,5	17	17,3	0,2

16,6	16,6	16,5	16,6	0,1
15,8	16,4		16,1	0,3
13,7	14,3	14,2	14,1	0,3

Tabelle 17: Ergebnisse von rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
63,6	62	83,8	69,8	9,9
56	48,9		52,5	3,6
38,8			38,8	0
36,7	36,1	34	35,6	1,2
34,9		30,9	32,9	2
24,3	28,5		26,4	2,1
	12,1		12,1	0

Tabelle 18: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
		389,2	389,2	0
205,8	194,4	245	215,1	21,7
	155,6		155,6	0
116,7	113,9	90	106,9	12
66,9			66,9	0
51,7	50,9	53,9	52,2	1,3
45,1			45,1	0
41,3		42,9	42,1	0,8
39,1	39,8	36,7	38,5	1,3
37,1	38	34,8	36,6	1,4
35,2	36,3	33,8	35,1	1
33,1	33	33,2	33,1	0,1
24,8	24,3	28,5	25,9	1,9
20,5		22,6	21,6	1,05
18,6	19,1	19,6	19,1	0,4
17,1	17,3	16,9	17,1	0,2
16,4	16,5		16,45	0,05
15,7	16,1	15,3	15,7	0,3
13,7	14,1		13,9	0,2

Tabelle 19: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
205,8	197,9	250,6	218,1	23,2
104,3	112,3		108,3	4
57,7	50	62,9	56,9	5,3
49,5	42,5		46	3,5
44,7	39,6		42,2	2,6
41,4	38,3	37,5	39,1	1,7
33,1	33,6		33,4	0,3
24,7	24,9	27,5	25,7	1,3
20,7	19,4		20,1	0,7
15,8			15,8	0
13,8			13,8	0

Tabelle 20: Ergebnisse von rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
65	56,4	83,1	68,2	11,1
56,9	48,3	66,1	57,1	7,3
	36,1	33,7	34,9	1,2

Tabelle 21: Ergebnisse vom Gemisch aus Bevacizumab und rtPA in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
199,5	171		185,25	14,3
99,5	107,9		103,7	4,2
65,7		68,5	67,1	1,4
58,2	56,4		57,3	0,9
	49,1		49,1	0
45,7	42,5		44,1	1,6
	39,5		39,5	0
	38,2	38,3	38,3	0,1
34	33,6		33,8	0,2
25,4	25	28,4	26,3	1,5
14,1	19,7		16,9	2,8

Bevacizumab und Plasmin

Tabelle 22: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
208,7	146,6	192	182,4	26,2
127,3	83,2	117,2	109,3	18,9
48	41,1	51,5	46,9	4,3
37,3	34,3	41,4	37,7	2,9
35,7	32,9	39,7	36,1	2,8
33,1	29,5	35,6	32,7	2,5
22,9	27,8	25,7	25,5	2
20,2			20,2	0
14,2			14,2	0

Tabelle 23: Ergebnisse von Plasmin in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
79,8		80,7	80,3	0,5
66,5	64,5	65,7	65,6	0,8
	45,9		45,9	0

Tabelle 24: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10) in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
182,1	134,7	173,1	163,3	20,6
114,2		102,6	108,4	5,8
		54	54	0
45,5	41,1	42	42,9	1,9
37		39,6	38,3	1,3
35,7	34,7	35,2	35,2	0,4
32,4	32,9		32,7	0,3
	29,4		29,4	0
22,5	27,9	25,9	25,4	2,2
20,6			20,6	0
13,8			13,8	0

Tabelle 25: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin) in der 1:10 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
174,8		166	170,4	4,4
112,8	127,3	100	113,4	11,2
		52,8	52,8	0
44	40,6	41,6	42,1	1,4
36,9		39,3	38,1	1,2
35,5	34,8	35,1	35,1	0,3
32,4	32,9		32,7	0,3
22,5	29,4		26	3,5
20,5	27,8	25,7	24,7	3,1
13,6			13,6	0

Tabelle 26: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
123	140,5	108,4	124	13,1
53,3	108,2	59,6	73,7	24,5
39,3	42,6	43,2	41,7	1,7
33,5	27,7	26,4	29,2	3,1
25,4			25,4	0
22,1			22,1	0

Tabelle 27: Ergebnisse von Plasmin in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
79,8	/	/	79,8	0

Tabelle 28: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10) in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
53,9	45,9	65,7	55,2	8,1
24,9	27,9	28	26,9	1,4

Tabelle 29: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin) in der 1:100 Verdünnung nach Färbung nach Coomassie (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
52,7	46,9	63,3	54,3	6,8
24,4	27,9	27,2	26,5	1,5

Tabelle 30: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
	226,2		226,2	0
146,8	129,5	123	133,1	10
65,1	52,4	63,1	60,2	5,6
40,8			40,8	0
38,2		37,2	37,7	0,5
36,3	35,1	34,2	35,2	0,9
33,2	33,6		33,4	0,2
	32,7	32,3	32,5	0,2
	31,1		31,1	0
	29,7	30,4	30,1	0,4
	27,9		27,9	0
26	27,1		26,6	0,6
21,6			21,6	0
19,9		20	20	0,1
18,7			18,7	0
16		17	16,5	0,5
13,7			13,7	0

Tabelle 31: Ergebnisse von Plasmin in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
		86,4	86,4	0
77,7		79,9	78,8	1,1
64	62,1		63,1	1
56,6			56,6	0
46,4	47,3		46,9	0,5
41,9			41,9	0
	27,5		27,5	0
15,7			15,7	0

Tabelle 32: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10) in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
183,2	207,7		195,5	12,3
	120	102,9	111,5	8,6
62,4	49	82,1	64,5	13,6
39,5			39,5	0
38,2		37,8	38	0,2
35,9	35,9	34,2	35,3	0,8
33	33,8		33,4	0,4
	32,4	32,3	32,4	0,1
	30,6		30,6	0
	29,4	29,9	29,7	0,3
	27,9		27,9	0
26,3	27		26,7	0,4
21,7		20	20,9	0,9
19,8			19,8	0
18,5			18,5	0
15,8		16,5	16,2	0,4
13,6			13,6	0

Tabelle 33: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin) in der 1:10 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
157,2	204,8	88,2	150,1	47,9
61,4	112,7	80,6	84,9	21,2
41,2	47,6		44,4	3,2
39,2			39,2	0
35,9	35,7	37,2	36,3	0,7
34,1	33,6	33,9	33,9	0,2
32,8	32,1	32,3	32,4	0,3
	30,4		30,4	0
	29,2	29,9	29,6	0,4
	27,9		27,9	0
26,9	27		27	0,1
21,9			21,9	0
19,9		19,7	19,8	0,1
19			19	0

18,3			18,3	0
15,4		16,1	15,8	0,4
13,2			13,2	0

Tabelle 34: Ergebnisse von Bevacizumab in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
149,3	239,6		194,5	45,2
59,4		65,5	62,3	3,1
46,1	48,6	50	48,2	1,6
41,5			41,5	0
38,7		38,7	38,7	0
33,5	34,8	33,7	34	0,6
	29,3	32,3	30,8	1,5
26,1	27,8	28,1	27,3	0,9
22,1	27,5	23,9	24,5	2,244994432
18,2		18,9	18,6	0,4
13,2			13,2	0

Tabelle 35: Ergebnisse von Plasmin in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
71,6	/	/	71,6	0
58			58	0

Tabelle 36: Ergebnisse vom Gemisch 1 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin 1:10) in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
151,9	229,5	80,6	154	60,8
58,4	49,7	53,3	53,8	3,6
41,7		41,3	41,5	0,2
38,8	35,9		37,4	1,5
33,5	29,5	32,5	31,8	1,7
	28	28,5	28,3	0,3
25,8	27,6	24,2	25,9	1,4
22,1			22,1	0
18,1			18,1	0

Tabelle 37: Ergebnisse vom Gemisch 2 aus Bevacizumab und Plasmin (5µl Bevacizumab + 3µl NaCl + 2µl Plasmin) in der 1:100 Verdünnung nach Silberfärbung (Molekulargewicht in kDa)

Gel 1	Gel 2	Gel 3	Mittelwert	Standardabweichung
154,5	229,5	79,1	154,4	61,4
58,4	48,3	52,6	53,1	4,1
41,5		40,5	41	0,5
38,5	36		37,3	1,3
33,4	29,4	32,5	31,8	1,7
	27,9	28,7	28,3	0,4
25,5	27,6	24,4	25,9	1,3
22,1			22,1	0
18,1			18,1	0

Abbildungen zur SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Abbildung 9: Gelelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Coomassie Färbung in der 1:10 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angegeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).

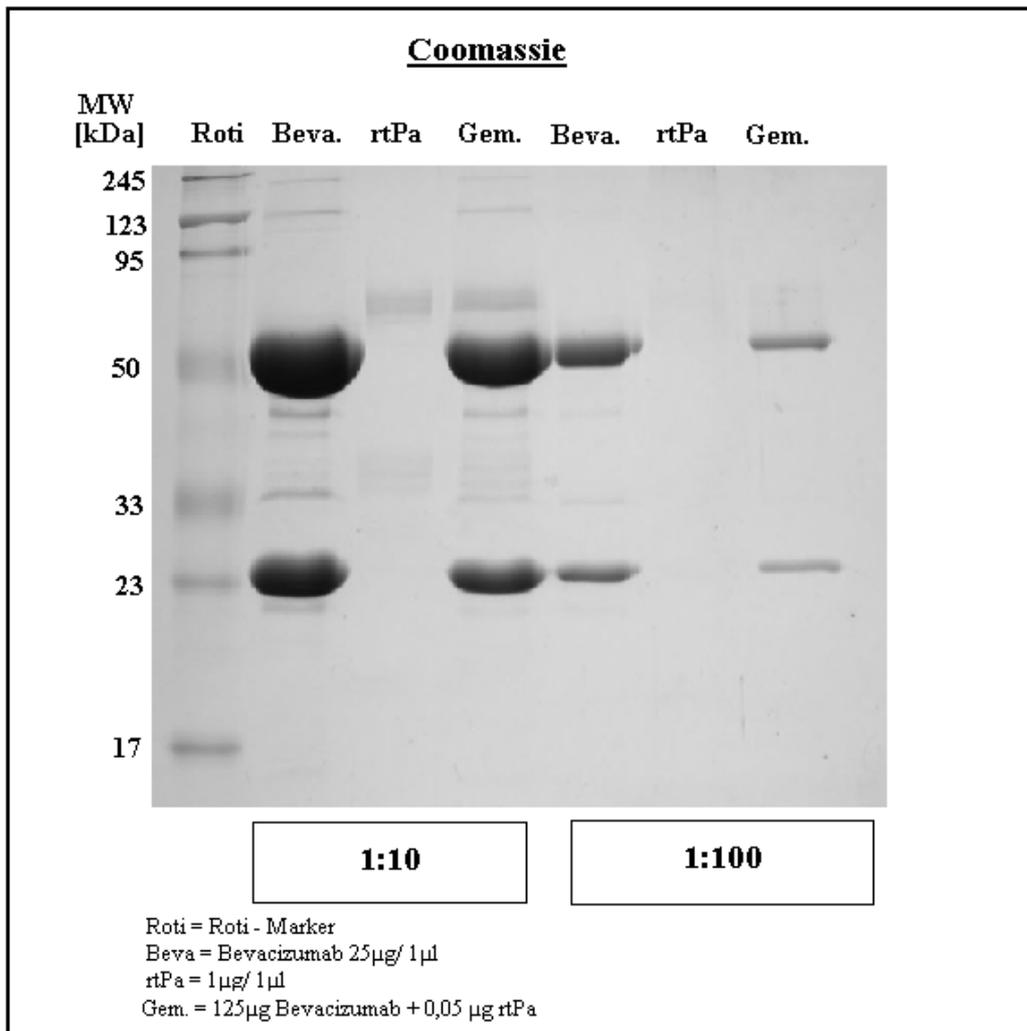


Abbildung 10: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Coomassie Färbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).

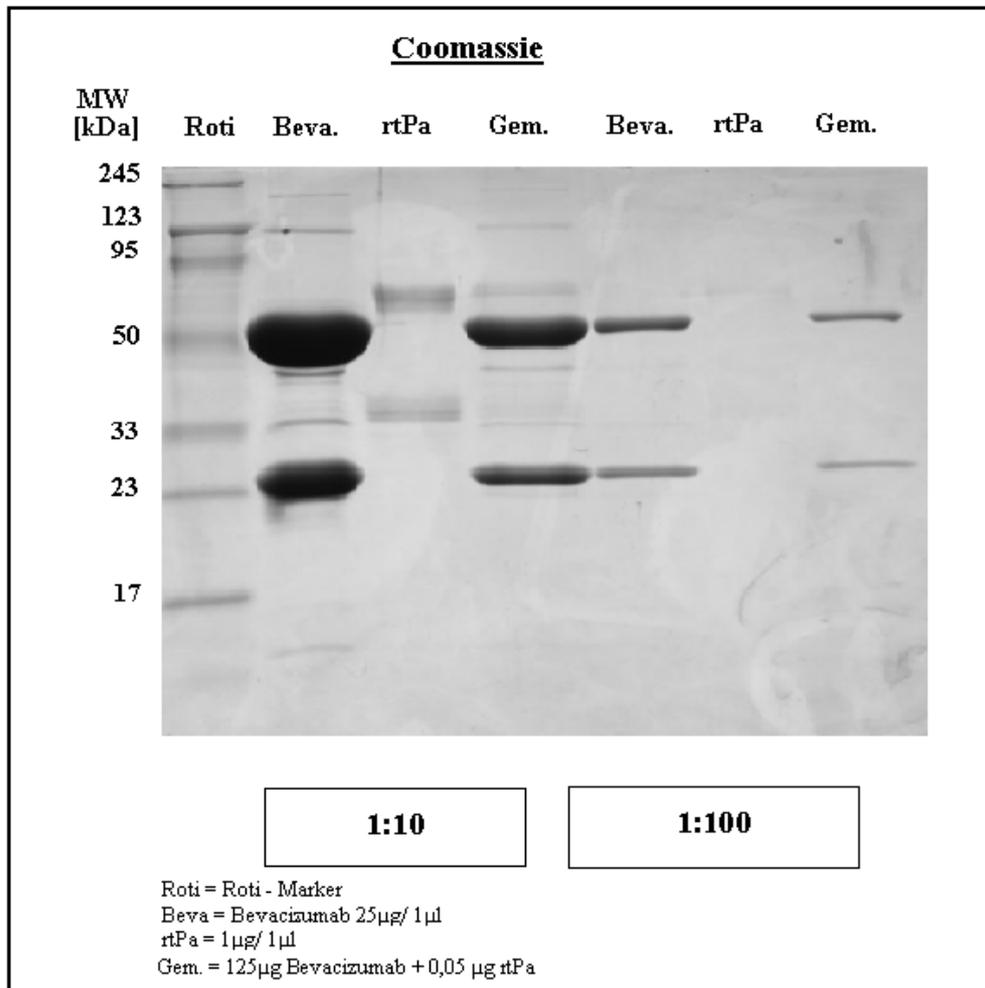


Abbildung 11: Gelelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).

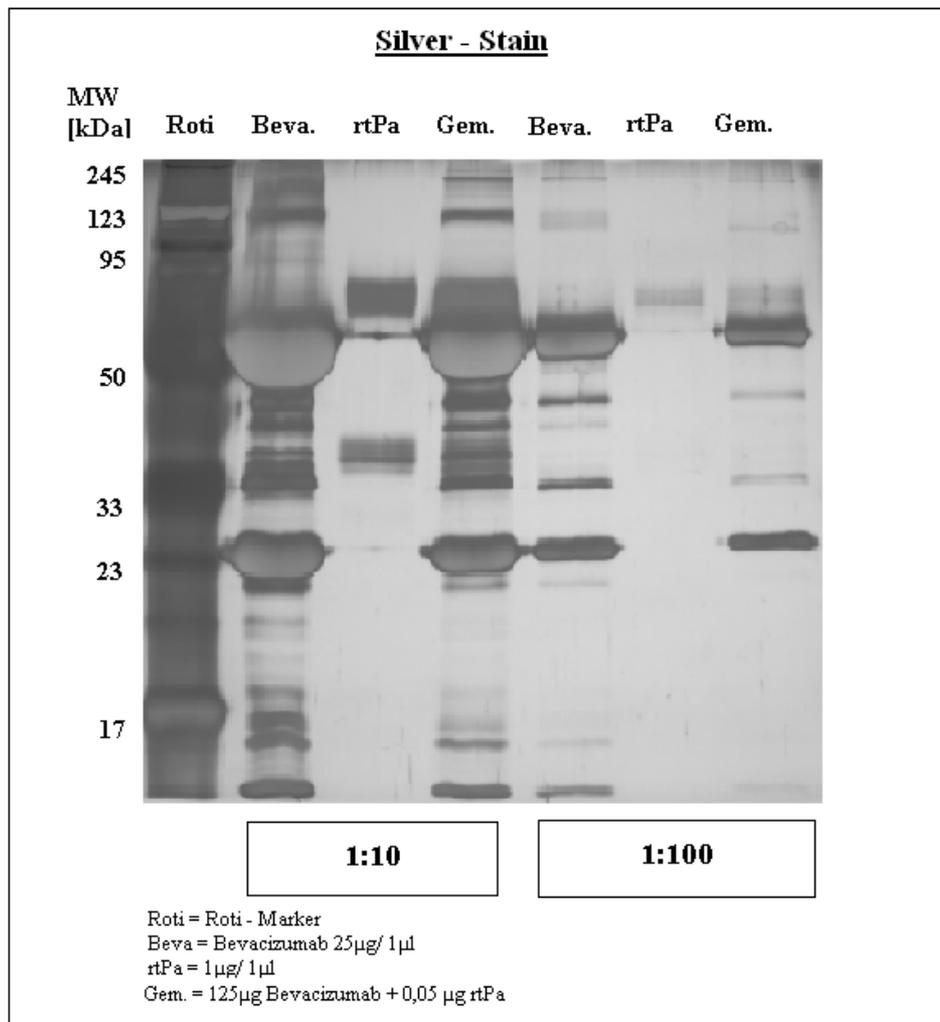


Abbildung 12: Gelelektrophorese (Gel 3) von Bevacizumab („Beva“), rtPA und dem Gemisch („Gem.“) aus Bevacizumab und rtPA nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDA“).

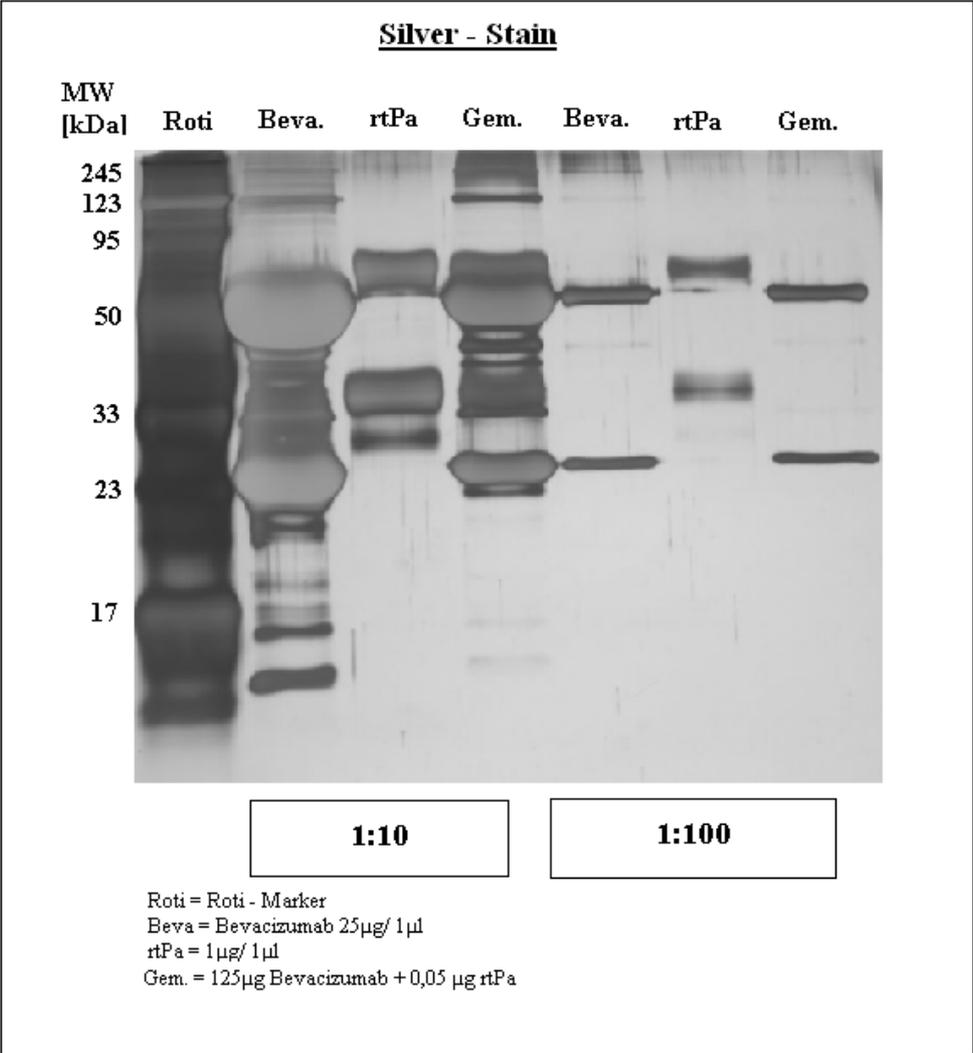


Abbildung 13: Gelelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, nach Färbung nach Coomassie in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angegeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).

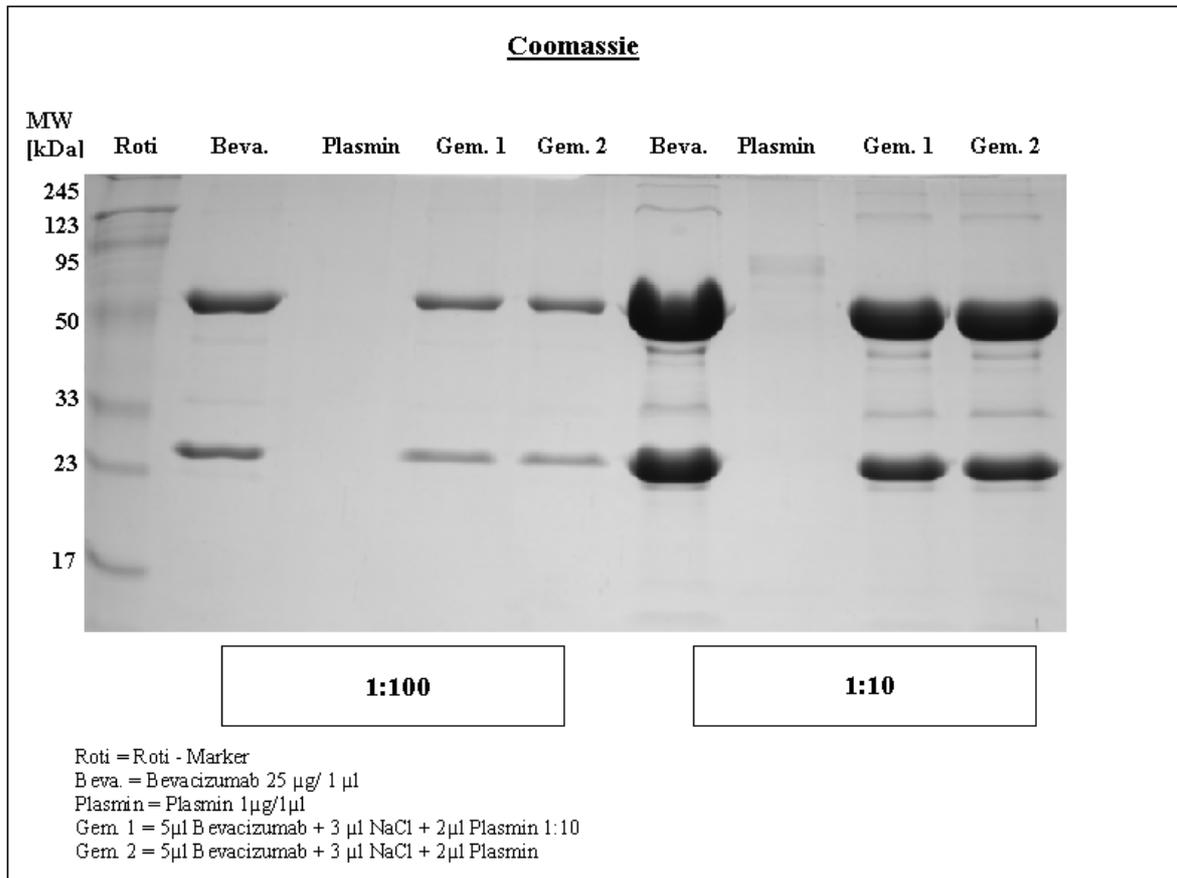


Abbildung 14: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, nach Färbung nach Coomassie in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).

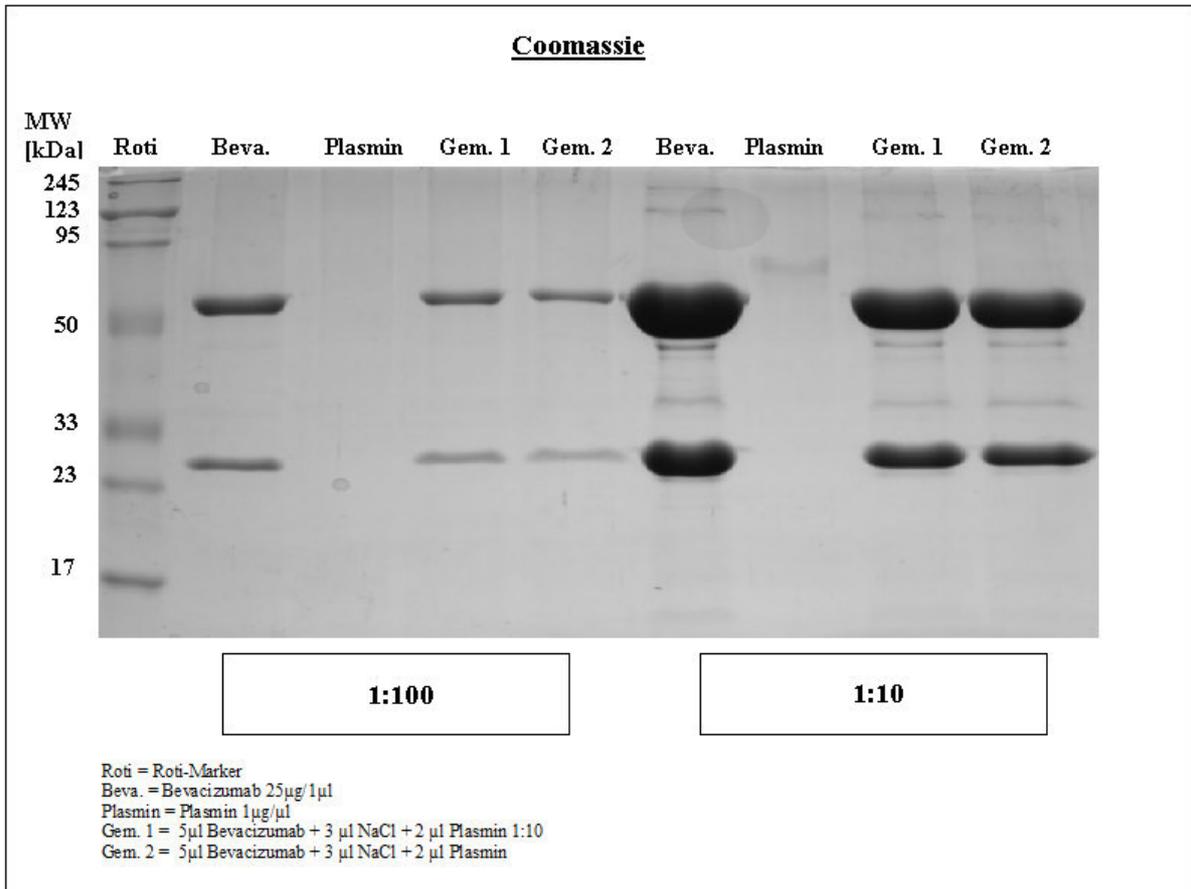


Abbildung 15: Gelelektrophorese (Gel 1) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).



Abbildung 16: Gelelektrophorese (Gel 2) von Bevacizumab („Beva“), Plasmin und den Gemischen („Gem.“) 1, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin 1:10, und 2, bestehend aus 5 µl Bevacizumab + 3 µl NaCl + 2 µl Plasmin, nach Silberfärbung in der 1:10 und 1:100 Verdünnung. Der Roti-Marker („Roti“) dient zur Lokalisation der Banden. Angegeben ist das Molekulargewicht („MW“) in Kilodalton („kDa“).



Literaturverzeichnis

Aisenbrey S., Lafaut B.A., Szurman P. (2002): Macular translocation with 360 degrees retinotomy for exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 120 (4), 451-459.

Algvere P.V., Berglin L., Gouras P. (1994): Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 232 (12), 707-716.

Algvere P.V., Gouras P., Dafgard K.E. (2006): Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur J Ophthalmol.* 9 (3), 217-230.

Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, et al. (2003): Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol.* 48 (3): 257-93.

Anderson D.H., Mullins R.F., Hageman G.S., Johnson L.V. (2002): A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 134 (3): 411-431.

Bhaskara A., Eng C. (2008): Bevacizumab in the treatment of a patient with metastatic colorectal carcinoma with brain metastases. *Clin Colorectal Cancer.* 7 (1): 65-68.

Bhisitkul R.B., Winn B.J., Lee O.T., et al. (2008): Neuroprotective effect of intravitreal triamcinolone acetonide against photoreceptor apoptosis in a rabbit model of subretinal hemorrhage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Vol. 49: 4071-4077.

Boujard D. et al. (2014): „Zell- und Molekularbiologie im Überblick“, Seite 56, Springer Verlag

Bressler N.M., Bressler S.B. (1995): Preventative ophthalmology. Age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 102, 1206-1211.

Bressler N.M., Bressler S.B., Childs A.L., et al. (2004): Surgery for hemorrhagic choroidal neovascular lesions of age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report No. 13. *Ophthalmology*. 111: 1993–2006.

Brody B.L., Roch-Levecq A.C., Gamst A.C., Maclean K., Kaplan R., Brown S.I. (2002): Self-management of age-related macular degeneration and quality of life: a randomized controlled trial. *Arch Ophthalmol*. 120 (11), 1477-1483.

Brown D.M., Michels M., Kaiser P.K., Heier J.S., Sy J.P., Ianchulev T. (2009): Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology* 116: 57e5–65 e.

Burk A., Burk R. (2014): Checkliste Augenheilkunde, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, p. 78-79.

Byeon S.H., Lee S.C., Choi S.H., Lee H.K., Lee J.H., Chu Y.K., Kwon O.W. (2010): Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 51: 1190-1197.

Casten R.J., Rovner B.W., Tasman W. (2004): Age-related macular degeneration and depression: a review of recent research. *Curr Opin Ophthalmol*. 15: 181-183.

CATT Research Group, Martin D.F., Maguire M.G., Ying G.S., Grunwald J.E., Fine S.L., Jaffe G.J. (2011): Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine*. 364: 1897-1908.

Chen C.Y., Hooper C., Chiu D., et al. (2007): Management of submacular hemorrhage with intravitreal injection of tissue plasminogen activator and expansile gas. *Retina*. 27 (3): 321-328.

Chen H.X., Cleck J.N. (2009): Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol*. 465–447.

Clauss M., Gerlach M., Gerlach H., Brett J., Wang F., Familletti P.C., Pan Y.C., Olander J.V., Connolly D.T., Stern D. (1990): Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity and promotes monocyte migration. *The Journal of Experimental Medicine*. 172: 1535-1545.

Congdon N., O'Colmain B., Klaver C.C., et al. (2004): Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 122: 477-485.

„Das große Tafelwerk“, 1. Auflage, Seite 27, Cornelsen Verlag

Donoso L.A., Kim D., Frost A., Callahan A., Hageman G. (2006): The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 51: 137-152.

de Jong P.T. (2006): Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 355: 1474-1485.

Eckardt C. (1996): Surgical removal of submacular neovascularization membranes. *Ophthalmologie* 93: 688–693.

Eckardt C., Eckardt U., Conrad H.G. (1999): Macular rotation with and without counter rotation of the globe in patients with age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 237: 313–325.

El Baba F., Jarrett W.H. II, Harbin T.S. jr., et al. (1986): Massive hemorrhage complicating age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 93: 1581-1592.

Fachinformation Avastin® 2012 Roche Pharma AG

Faure C., Macrez R., Vivien D., et al (2011): Interaction study between rtPA and bevacizumab. *Br J Ophthalmol.* 95:743-744.

Ferrara N., Davis-Smyth T. (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews* 18: 4-25.

Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. (2003): The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9: 669-676.

Ferrara N., Damico L., Shams N., Lowman H., Kim R. (2006): Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 26: 859-870.

Ferrara N. (2009): Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 29: 789-791.

Gass J.D. (1994): Biomicroscopic and histopathologic considerations regarding the feasibility of surgical excision of subfoveal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol.* 118: 285–298.

Glatt H., Machemer R. (1982): Experimental subretinal hemorrhage in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 94: 762-763.

Grehn F. (2008): *Augenheilkunde, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag*, p. 38, p. 205-208, p. 242-244.

Grossniklaus H.E., Green W.R. (2004): Choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol.* 137: 496-503.

Guthoff R., Guthoff T., Meigen T., Goebel W. (2011): Intravitreal injection of bevacizumab, tissue plasminogen activator, and gas in the treatment of submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Retina* 31:36–40.

Hageman G.S., Luthert P.J., Viktor Chong N.H., Johnson L.V., Anderson D.H., Mullins R.F. (2001): An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 20: 705-732.

Handwerger B.A., Blodi B.A., Chandra S.R., et al. (2001): Treatment of submacular hemorrhage with low-dose intravitreal tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement. Arch Ophthalmol. 119: 28-32.

Hauptert C.L., McCuen B.W. 2nd, Jaffe G.J., Steuer E.R., Cox T.A., Toth C.A., Fekrat S., Postel E.A. (2001): Pars plana vitrectomy, subretinal injection of tissue plasminogen activator, and fluid-gas exchange for displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol. 131(2): 208-215.

Hawkins B.S., Bressler N.M., Miskala P.H. (2004): Surgery for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: ophthalmic findings: SST report no.11. Ophthalmology 111: 1967-1980

Hee M.R., Bauman C.R., Puliafito C.A., Duker J.S., Reichel E., Wilkins J.R., Coker J.G., Schuman J.S., Swanson E.A., Fujimoto J.G. (1996): Optical coherence tomography of age-related macular degeneration and choroidal neovascularization. Ophthalmology 103: 1260-1270.

Heidelberg Engineering:

<http://www.heidelbergengineering.com/germany/produkte/spectralis/bildgebungsverfahren/infra-reflexion>

Heiduschka P., Fietz H., Hofmeister S. et al. (2007): Penetration of Bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. Invest Ophthalmol Vis Sci. 48: 2814-2823.

Herdegen T., et al. (2008): „Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie“, Georg Thieme Verlag; Seite 122.

Hesse L., Schmidt J., Kroll P. (1999): Management of acute submacular hemorrhage using recombinant tissue plasminogen activator and gas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 237: 273-277.

Hesse L. (2001): Einsatz von Enzymen am hintern Augenabschnitt. *Ophthalmologie* 98: 1176-1180.

Hillenkamp J., Surguch V., Framme C., et al. (2010): Management of submacular hemorrhage with intravitreal versus subretinal injection of recombinant tissue plasminogen activator. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 248: 5–11.

Holmes D.I., Zachary I. (2005): The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 6: 209.

Holz, F.G., et al. (1997): „Altersabhängige Makuladegeneration“, Springer: Berlin, Heidelberg, New York: 22-36.

Holz F.G., Helb H.M., Bindewald-Wittich A., Scholl H.P.N. (2006): Moderne Arzneimitteltherapie der altersabhängigen Makuladegeneration. *Der Internist* 47: 192-198.

Holz F.G., Pauleikhoff D., Spaide R.F., Bird A.C. (2011): Altersabhängige Makuladegeneration. 3. Auflage: Berlin Heidelberg

Ip M.S., Scott I.U., Brown G.C., et al. (2008): Anti-vascular endothelial growth factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 115: 1837-1846.

Jackson T.L., Antcliff R.J., Hillenkamp J., Marshall J. (2003): Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44:2141-2146.

Johnson M.W., Olsen K.R., Hernandez E. (1991): Tissue plasminogen activator treatment of experimental subretinal hemorrhage. *Retina* 11: 250-258.

Kaiser P.K. (2006): Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol* 142: 660-668.

Kamei M., Misono K., Lewis H. (1999): A study of the ability of tissue plasminogen activator to diffuse into the subretinal space after intravitreal injection in rabbits. *Am J Ophthalmol.* 128: 739-746.

Keyt B.A., Berleau L.T., Nguyen H.V., et al. (1996): The carboxylterminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 271: 7788-7795.

Klettner A., Roider J. (2008): Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 4523-4527.

Kirchoff B. (2000): „Die altersbedingte Makuladegeneration“, *Deutsches Ärzteblatt* 97: 1458-1462.

Kijlstra A., La Heij E., Hendrikse F. (2005): Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. *Ocul Immunol Inflamm.* 13: 3-11.

Klein R., Peto T., Bird A., Van Newkirk M.R. (2004): The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 137: 486-495.

Kroll J., Waltenberger J. (1998): VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 743-746.

Lang G.K. (2008): *Augenheilkunde.* 2, Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG, p. 289, p. 293-298, p. 337-334.

Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD des BVA und der DOG e.V.

Lim J.H., Wickremasinghe S.S., Xie J., et al. (2012): Delay to treatment and visual outcomes in patients treated with anti-vascular endothelial growth factor for age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol.* 153: 678-686.

Lüllmann-Rauch, R. (2003): *Histologie,* S. 504, Thieme Verlag

Macular Photocoagulation Study Group (1997): Risk factors for choroidal neovascularization in the second eye of patients with juxtafoveal or subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 115: 741-747.

Marneros A.G., Fan J., Yokoyama Y., Gerber H.P., Ferrara N., Crouch R.K., Olsen B.R. (2005): Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is

essential for choriocapillaris development and visual function. *The American Journal of Pathology* 167: 1451-1459.

Mars W.M., Zarnegar R., Michalopoulos G.K. (1993): Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol.* 143: 949-958.

Matt G., Sacu S., Stifter E., Prunte C., Schmidt-Erfurth U. (2010): Combination of Intravitreal rtPA, gas and ranibizumab for extensive subfoveal haemorrhages secondary to neovascular age-related macular degeneration. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 227: 221-225.

Meyer C.H., Scholl H.P., Eter N., et al. (2008): Combined treatment of acute subretinal haemorrhages with intravitreal recombinant tissue plasminogen activator, expansile gas and bevacizumab: a retrospective pilot study. *Acta Ophthalmol.* 86: 490-494.

Michels S., Rosenfeld P.J., Puliafito C.A., Marcus E.N., Venkatraman A.S. (2005): Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 112: 1035-1047.

Mignatti R., Rifkin D.B. (1996): Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49: 117-137.

Moja L., Lucenteforte E., Kwag K.H., Bertele V., Campomori A., Chakravarthy U., D'Amico R., Dickersin K., Kodjikian L., Lindsley K., Loke Y., Maguire M., Martin D.F., Mugelli A., Mühlbauer B., Püntmann I., Reeves B., Rogers C., Schmucker C., Subramanian M.L., Virgili G. (2014): Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev.* 9:CD011230. doi: 10.1002/14651858.CD011230.pub2

Moshfeghi D.M., Lewis H. (2003): Age-related macular degeneration: Evaluation and treatment. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 70: 1017-1037.

Nishijima K., Ng Y.S., Zhong L., Bradley J., Schubert W., Jo N., Akita J., Samuelsson S.J., Robinson G.S., Adamis A.P., Shima D.T. (2007): Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American Journal of Pathology* 71: 53-67.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB*, 13: 9-22.

Olivier S., Chow D.R., Packo K.H. (2004): Subretinal recombinant tissue plasminogen activator injection and pneumatic displacement of thick submacular hemorrhage in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 111: 1201-1208.

Pascolini D., Mariotti S.P., Pokharel G.P., et al. (2004): Global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies. *Ophthalmic Epidemiol* 11: 67-115.

Penfold P., Killingsworth M., Sarks S. (1985): Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells, *Graefes Archives for Clinical & Experimental Ophthalmology* 223(2): 69-76.

Pepper M.S, Farrara N., Orci L., Montesano R. (1991): Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 181: 902-906.

Poliner L.S., Olk R.J., Burgess D., Gordon M.E. (1986): Natural history of retinal pigment epithelial detachments in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 93:543-551.

Pufe T., Harde V., Petersen W., et al. (2004): Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces matrix metalloproteinase expression in immortalized chondrocytes. *J Pathol.* 202: 367-374.

Puliafito C.A., Hee M.R., Schuman J.S., Fujimoto J.G. (2004): Optical coherence tomography of ocular diseases SLACK incorporated, 6900 grove road Thorofare, NJ 1-55642-609-7, pp 3-34 2nd ed

Rehm H. (2006): „Der Experimentator: Proteinbiochemie; Gustaf-Fischer Verlag, 5.Auflage, ISBN 3-437-25750.

Rosenfeld P.J., Brown D.M., Heier J.S., Boyer D.S., Kaiser P.K., Chung C.Y., Kim R.Y. (2006): Ranibizumab for neovascular age related-macular degeneration. *N Engl J Med.* 355: 1419-1431.

Sachsenweger M. (2003): Duale Reihe Augenheilkunde, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, p. 248-251, p.254-255, p. 274-277.

Schmitz-Valkenberg S., Fleckenstein M., Göpel A.P., Lindner M., v. Strachwitz C., Holz F.G. (2014): prakt. Augenheilkd. 35: 275-286.

Schouten J.S., La Heij E.C., Webers C.A., et al. (2009): A systematic review on the effect of bevacizumab in exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247: 1-11.

Schrader W.F. (2006): Age-related macular degeneration: a socioeconomic time bomb in our aging society. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 103: 742-748.

Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.

Spilisbury K., Garrett K.L., Shen W.Y., Constable I.J., Rakoczy P.E. (2000): Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *The American Journal of Pathology* 157: 135-144.

Steel D.H.W., Sandhu S.S. (2011): Submacular haemorrhages associated with neovascular age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 95: 1051-1057.

Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands (2014): Die Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration: Therapeutische Strategien.

Stewart M.W., Rosenfeld P.J., Penha F.M., Wang F., Yehoshua Z., Bueno-Lopez E., Lopez P.F. (2012): Pharmacokinetic rationale for dosing every 2 weeks versus 4 weeks with intravitreal ranibizumab, bevacizumab, and aflibercept (vascular endothelial growth factor Trap-eye). *Retina* 32(3): 434-357.

Su E.J., Fredriksson L., Geyer M., et al (2008): Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med.* 14: 731-737.

Takeuchi A., Kricorian G., Yao X.Y., et al. (1994): The rate and source of albumin entry into saline-filled experimental retinal detachments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35: 3792-3798.

Thomas M.A., Dickinson J.D., Melberg N.S. (1994): Visual results after surgical removal of subfoveal choroidal neovascular membranes. *Ophthalmology* 101: 1384-1396.

Toth C.A., Morse L.S., Hjelmelland L.M., et al. (1991): Fibrin directs early retinal damage after experimental subretinal hemorrhage. *Arch Ophthalmol.* 109: 723-729.

Toth C.A., Narayan D.G., Boppart S.A., Hee M.R., Fujimoto J.G., Birngruber R., Cain C.P., Di Carlo C.D., Roach W.P. (1997): A comparison of retinal morphology viewed by optical coherence tomography and by light microscopy. *Arch Ophthalmol.* 115: 1425-1428.

Treumer F., Klatt C., Roider J., Hillenkamp J. (2010): Subretinal co-application of recombinant tissue plasminogen activator and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol.* 94: 48-53.

Treumer F., Roider J., Hillenkamp J. (2012): Long-term outcome of subretinal co-application of rtPA and bevacizumab followed by repeated intravitreal anti-VEGF injections for neovascular AMD with submacular hemorrhage. *Br J Ophthalmol.* 96(5): 708-713.

Vander J.F., Federman J.L., Greven C., et al. (1991): Surgical removal of massive subretinal hemorrhage associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 98: 23-27.

Verheul H.M., Lolkema M.P., Qian D.Z., et al. (2007): Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 13: 5341-5347.

Virgili G., Bini A. (2007): Laser photocoagulation for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev:* CD004763.

Wahl H.-W., Heyl V., Langer N. (2008): Quality of life by limited vision in old age: the example of age-related macular degeneration. *Ophthalmologie* 105(8): 735-743.

Wang H., Keiser (1998): Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res.* 83: 832-840.

Weber B.H.F., Charbel Issa P., Pauly D., Herrmann P., Grassmann F., Holz F.G. (2014): The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int.* 111(8): 133–8. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0133.

Willett C., Boucher Y., di Tomaso E., et al. (2004): Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nature medicine*. Bd. 10, No. 2, p. 145-147.

Yamazaki Y., Morita T. (2006): Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity* 10: 515-527.

Young R.W. (1987): Pathophysiology of age-related macular degeneration, *Surv Ophthalmol*. 31: 291-306.

Zarbin M.A. (2004): Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 122: 598-614.

Ziemssen F., Salvatore Grisanti S., Bartz-Schmidt K.U., Schulz M. (2006): Innovative Therapien für eine häufige Erblindungsursache. *Pharmazeutische Zeitung* 23: 1395.

Danksagung

Vielen Dank an all diejenigen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Johann Roider, Direktor der Klinik für Ophthalmologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, für den Arbeitsplatz im Labor, die freundliche Aufnahme in die Klinik und die guten Arbeitsbedingungen.

Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Jost Hillenkamp für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die hilfreiche Unterstützung, den stetigen Dialog und die hilfreichen Ratschläge bedanken.

Herzlichsten Dank geht auch an Frau Professor Dr. Alexa Klettner, die während der Laborarbeit immer helfend beiseite stand und mich auch in der Zeit danach jeder Zeit engagiert unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Serap Luick und Monika Marquardt für ihre Hilfe im Laboralltag bedanken.

Den anderen Doktorandinnen und Doktoranden gilt ebenfalls mein Dank für die gegenseitige Hilfe, Motivation und fröhliche Zusammenarbeit.

Der größte Dank gilt von ganzem Herzen meiner geliebten Familie. Meinen Eltern, Kristina und Dieter Puls, danke ich, dass sie mir mein Studium erst möglich gemacht haben und mich in meinen Vorhaben immer bedingungslos unterstützt und motiviert haben. Insbesondere möchte ich meiner wundervollen Tochter Tori danken, die im letzten Jahr zugleich größte Ablenkung als auch größte Motivation war und der ich diese Arbeit widmen möchte. Björn danke ich für das Wichtigste.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Svenja Puls

Am Wohld 32

24109 Kiel

geboren am 10.08.1984 in Ratzeburg

eMail: Svenja_Puls@web.de

Schulbildung

1991-1995 Grundschule St. Georgsberg, Ratzeburg

1995-2004 Lauenburgische Gelehrtenschule, Ratzeburg

2004 Abitur

Weiterbildung nach der Schulzeit

2004 - 2006 Ausbildung zur Rettungsassistentin

 Theoretischer Abschnitt: DRK - Sanitätsschule, Lübeck

 Praktischer Abschnitt: DRK - Rettungsdienst Hzgt. Lauenburg

Hochschulstudium

2006-2012 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2008 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2012 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

November 2012 Approbation als Arzt

seit 02/2013 Assistenzärztin in der Abteilung Anästhesie und operative Intensivmedizin des
 Städtischen Krankenhaus Kiel GmbH

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen

Hillenkamp J., Klettner A., **Puls S.**, Treumer F., Roeder J.

Subretinale Koapplikation von rtPA und Bevacizumab bei exsudativer altersbedingter Makuladegeneration mit submakulärer Blutung

Ophthalmologe. 2012 Jul;109(7):648-56. doi: 10.1007/s00347-012-2564-5.

Klettner A., **Puls S.**, Treumer F., Roeder J., Hillenkamp J.

Compatibility of Recombinant Tissue Plasminogen Activator and Bevacizumab Co-Applied for Neovascular Age-Related Macular Degeneration With Submacular Hemorrhage

Arch Ophthalmol. 2012 Jul;130(7):875-881. doi: 10.1001/archophthalmol.2012.120.

Kongressbeiträge

64. Tagung der Vereinigung der Norddeutschen Augenärzte, Rostock-Warnemünde, 23.-24. Mai 2014

Hillenkamp J., Grotelüsch S., **Puls S.**, Klettner A., Roeder J.

Chirurgische Therapie der akuten submakulären Blutung bei der AMD mit rtPA und verschiedenen VEGF-Antagonisten

109. DOG Kongress 29.09.-2.10.2011, Berlin

Hillenkamp J., **Puls S.**, Klettner A., Treumer F., Roeder J.

Experimental Co-Application of Recombinant Tissue Plasminogen Activator (rtPA) and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration (AMD) with Submacular Hemorrhage

V. International DOG Symposium, Age-Related Macular Degeneration - Fundamental aspects and translation into new treatments, 8.-10- September 2011

Hillenkamp J., **Puls S.**, Klettner A., Treumer F., Roider J.

Submacular hemorrhage in neovascular AMD - treatment options

24. Jahrestagung der Retinologischen Gesellschaft, 17.-18.06.2011, Aachen

Hillenkamp J., **Puls S.**, Klettner A., Treumer F., Roider J.

Kompatibilität von rtPA und Bevacizumab bei neovaskulärer AMD mit submakulärer Blutung

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

.....
(Svenja Puls)