

# **VEGF-Inhibition bei der Frühgeborenenretinopathie**

**– Präklinische und klinische Aspekte –**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Johanna Madeleine Walz aus

Pfarrkirchen

im Jahr 2017



Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 12.12.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. med. Lothar Färber.



Meiner Familie

*- Erst das Auge erschafft die Welt -*

Christian Morgenstern



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1      Einleitung .....</b>	<b>14</b>
1.1      Pränatale Entwicklung unter besonderer Betrachtung des Auges .....	14
1.1.1      Allgemeine Entwicklung .....	14
1.1.2      Rolle von VEGF-A in der prä- und postnatalen Entwicklung .....	15
1.1.3      Entstehung des Auges .....	17
1.1.4      Aufbau und Entwicklung des Gefäßnetzes des Auges .....	20
1.2      Frühgeborenenretinopathie .....	21
1.2.1      Frühgeburt und mögliche Folgekomplikationen .....	21
1.2.2      Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland .....	22
1.2.3      Pathophysiologie der Erkrankung .....	22
1.2.4      Geschichte der Behandlung und Prävention der Frühgeborenenretinopathie .....	25
1.2.5      Diagnose und aktuelle Behandlungsoptionen inklusive Sicherheitsaspekte .....	28
1.2.6      Besonderheiten von klinischen Prüfungen bei Frühgeborenen .....	31
1.2.6.1      Rechtliche Aspekte .....	31
1.2.6.2      Besondere Situation der Eltern .....	32
1.3      Grundlagen retinaler angioproliferativer Erkrankungen .....	33
1.3.1      Vaskuläre Strukturen im Zusammenhang mit angioproliferativen retinalen Erkrankungen .....	33
1.3.1.1      Sphäroidmodell .....	33
1.3.1.2      OIR-Modell .....	34
1.3.1.3      Vaskulogenese und Angiogenese .....	35
1.3.1.4      Beteiligung von VEGF-A an retinalen proliferativen Erkrankungen – VEGF-A-Signalweg .....	36
1.3.2      VEGF-Inhibition als Behandlungsoption retinaler vaskulärer Erkrankungen .....	38

## Inhaltsverzeichnis

1.3.3	Beteiligung neuronaler Strukturen an retinalen vaskulären Erkrankungen .....	41
1.3.3.1	Neuro-vaskuläres Interface.....	41
1.3.3.2	Primäre retinale Zellkultur .....	42
1.3.4	miRNAs in Endothelzellen und im Zusammenhang mit Angiogenese .....	43
1.3.4.1	Biogenese und Wirkmechanismus von miRNA.....	43
1.3.4.2	miRNAs in Endothelzellen .....	45
1.3.4.3	AngiomiRs .....	45
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Präklinische Aspekte.....</b>	<b>50</b>
3.1	Materialien.....	50
3.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	50
3.1.2	Primer für qRT-PCR .....	54
3.1.3	Puffer, Lösungen und Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	55
3.2	Methoden .....	57
3.2.1	Isolation und Zellkultivierung von (primären) Zellen.....	57
3.2.1.1	Kultivierung humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HRMVEC) und humaner umbilikalvenöser Endothelzellen (HUVEC) .....	57
3.2.1.2	Zellisolation und Kultivierung primärer neuronaler Zellen aus murinen Retinae .....	57
3.2.2	Untersuchung der Wirkung von VEGF-Inhibitoren auf das neuro-vaskuläre Interface.....	59
3.2.2.1	Herstellung von Sphäroiden im hängenden Tropfen.....	59
3.2.2.2	Sproutingassay .....	60
3.2.3	Bestimmung des miRNA Profils von retinalen Endothelzellen unter Hungerbedingung, sowie angiogener Stimulation bzw. Hemmung dieser Stimulation durch VEGF-Inhibitoren .....	62
3.2.3.1	Versuchsaufbau .....	62
3.2.3.2	Auswertung der miRNA Sequenzierdaten .....	65



3.2.3.3	miRNA Extraktion für nachfolgende qPCR.....	66
3.2.3.4	Reverse Transkription .....	67
3.2.3.5	Quantitative Echtzeit-PCR.....	68
3.2.3.6	Expression ausgewählter miRNAs im OIR-Modell .....	69
3.2.3.7	<i>In silico</i> Analyse der miRNA Targets.....	71
3.2.3.8	Exemplarische Untersuchung des Effekts der miR-335-5p auf das Sphäroid-Angiogenesemodell .....	72
3.3	Ergebnisse .....	76
3.3.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> Modells für das neuro-vaskuläre Interface.....	76
3.3.1.1	Beeinflussung sphäroidaler Sprossung durch ko-kultivierte primäre retinale Zellen .....	76
3.3.1.2	Einfluss von VEGF-Inhibition auf die neuro-vaskuläre Interaktion von primären retinalen Zellen mit Endothelzellsphäroiden .....	79
3.3.2	miRNA Expressionsprofil retinaler Endothelzellen unter Hungerbedingung im Vergleich zu angiogener Stimulation mit und ohne VEGF-Inhibition.....	81
3.3.2.1	Next Generation Sequencing (NGS).....	81
3.3.2.2	Reproduzierbarkeit der NGS-Ergebnisse in unabhängigen Versuchen.....	88
3.3.2.3	Expression bestimmter miRNAs <i>in vivo</i> .....	92
3.3.2.4	<i>In silico</i> Target Analyse ausgewählter miRNAs .....	93
3.3.2.5	Untersuchung des Effekts einer Transfektion von HRMVECs mit miR-335-5p im Sphäroid-Angiogenesemodell .....	98
3.4	Diskussion – präklinischer Teil .....	100
3.4.1	<i>In vitro</i> Modell für das neuro-vaskuläre Interface und Beeinflussung durch VEGF-Inhibition..	100
3.4.1.1	Beeinflussung sphäroidaler Sprossung durch ko-kultivierte primäre retinale Zellen .....	102
3.4.1.2	Einfluss von VEGF-Inhibition auf die durch neuronale Zellen induzierte Sprossung.....	103
3.4.2	Einfluss von VEGF und VEGF-Inhibition auf das miRNA Expressionsprofil in humanen retinalen mikrovaskulären Endothelzellen.....	104

## Inhaltsverzeichnis

3.4.2.1	miRNA Profil in HRMVECs .....	105
3.4.2.2	Änderung des miRNA Profils unter angiogener Stimulation <i>in vitro</i> .....	106
3.4.2.3	Beeinflussung des miRNA Profils durch VEGF-Inhibitoren .....	108
3.4.2.4	miRNA Expression im OIR-Modell mit und ohne VEGF-Inhibition .....	110
3.4.2.5	Beeinflussung der Gefäßsprossung in HRMVEC-Sphäroiden durch hsa-miR-335-5p .....	112
3.4.2.6	Abschließende Bewertung der Untersuchung von miRNA Profilen .....	114
3.5	Zusammenfassung präklinischer Teil .....	115
<b>4</b>	<b>Klinische Aspekte .....</b>	<b>118</b>
4.1	Materialien und Methoden .....	118
4.1.1	Retina.net ROP Register .....	118
4.1.2	NCT02134457-CARE-ROP: Eine klinische Studie zum Vergleich zweier Dosierungen von Ranibizumab in Bezug auf Sicherheit und Effektivität bei Frühgeborenenretinopathie .....	120
4.1.2.1	Hintergrund der klinischen Prüfung .....	120
4.1.2.2	Studiendesign und Zielparameter .....	121
4.1.2.3	Ein- und Ausschlusskriterien .....	122
4.1.2.4	Behandlungsarme und Verblindung im Rahmen der CARE-ROP Studie .....	123
4.1.2.5	Visitenablauf der Kernstudie .....	124
4.1.2.6	Visitenablauf-Follow-Up .....	125
4.1.2.7	Data Safety Monitoring Board und Reading Center .....	126
4.1.2.8	Besonderheit klinische Studie bei Frühgeborenen .....	126
4.1.2.9	Qualitätsprobleme der „Low Volume Syringe“ und resultierende Studienunterbrechung .....	127
4.1.3	VEGF-A-Messmethodik .....	128
4.1.3.1	Verwendete Materialien .....	128
4.1.3.2	Aufbau des Projekts .....	130
4.1.3.3	Untersuchte Parameter .....	132

4.1.3.4	ELISA.....	133
4.1.3.5	Luminex.....	134
4.1.3.6	Statistische Analyse .....	134
4.2	Ergebnisse .....	135
4.2.1	Frühgeborenenretinopathie Register .....	136
4.2.1.1	Patientenkohorte .....	136
4.2.1.2	Relevante Komorbiditäten und Sauerstoffsupplementation .....	138
4.2.1.3	Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung .....	139
4.2.1.4	Zeitpunkt und Art der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie .....	142
4.2.1.5	Wiederauftreten der Frühgeborenenretinopathie und Wiederbehandlung .....	146
4.2.1.6	Assoziation demographischer Faktoren mit der Wiederbehandlungshäufigkeit .....	148
4.2.1.7	Verwendete Anästhetika und mit der Behandlung assoziierte Komplikationen.....	149
4.2.2	Sicherheitsaspekte der ersten dreizehn Patienten der CARE-ROP Studie.....	152
4.2.2.1	Baselinecharakteristika der ersten 13 Patienten der CARE-ROP Studie.....	152
4.2.2.2	Re-Injektionen und Rescue-Fälle .....	153
4.2.2.3	Vorkommen von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen.....	154
4.2.2.4	Todesfälle.....	156
4.2.3	Überprüfung des Einflusses präanalytischer Parameter auf die systemischen VEGF-Konzentrationen .....	156
4.2.3.1	Regressionsanalyse .....	157
4.2.3.2	Art der Kanüle .....	158
4.2.3.3	Antikoagulantien.....	159
4.2.3.4	Füllstand der Blutröhrchen .....	160
4.2.3.5	Zeit vor und nach Zentrifugation .....	161
4.2.3.6	Zentrifugenart .....	163

## Inhaltsverzeichnis

4.2.3.7	Geschlecht.....	164
4.2.3.8	Intrapersonelle Fluktuationen der VEGF-A-Spiegel im Verlauf einer Woche .....	165
4.2.3.9	Messzentren .....	165
4.2.3.10	Einfluss der Messmethodik auf VEGF-A-Spiegel.....	166
4.2.3.11	VEGF-A-Spiegel von Extremwerten.....	168
4.3	Diskussion - klinischer Teil .....	169
4.3.1	ROP Register .....	169
4.3.2	Beantwortung der noch offenen Fragen mit Hilfe der CARE-ROP Studie?.....	173
4.3.3	Design der CARE-ROP Studie .....	174
4.3.4	Sicherheitsdaten betrachtet durch das DSMB.....	175
4.3.5	VEGF-A-Messmethodikprojekt .....	178
4.4	Zusammenfassung klinischer Teil .....	181
<b>5</b>	<b>Fazit – Beantwortung der Forschungsfragen und Ausblick .....</b>	<b>184</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>188</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>190</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>192</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>194</b>
<b>10</b>	<b>Zusätzliche Anmerkungen.....</b>	<b>195</b>
<b>11</b>	<b>Glossar der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>196</b>
<b>12</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>198</b>
<b>13</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>202</b>
<b>14</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>204</b>
14.1	Normalisierung der qPCR Daten im OIR-Modell.....	204

14.2	Vorkommen der 67 statistisch signifikant veränderten miRNAs in den jeweiligen Bedingungen .. .....	205
14.3	Hsa-let-7e-5p als die am wenigsten regulierte miRNA zwischen den verschiedenen Vergleichen. .....	208
14.4	Visitenschemata der CARE-ROP Studie.....	210
14.5	Liste der Ereignisse, die in der CARE-ROP nicht als SUE innerhalb von 24 h gemeldet werden mussten.....	214
14.6	Schema Probenbehandlung nach Blutentnahme in der CARE-ROP Studie .....	215
<b>15</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>216</b>



# 1 Einleitung

Bereits 1942 wurde die Frühgeborenenretinopathie zum ersten Mal beschrieben (1). Dennoch sind viele Fragen rund um diese Erkrankung weiterhin ungeklärt. Die Art der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie hat sich in den letzten Jahren deutlich gewandelt, sodass die Laserkoagulationstherapie weiter als Standardtherapie gilt, VEGF-Inhibitoren jedoch immer mehr eingesetzt werden. Da diese Therapie Form noch in vielen Aspekten Fragen aufwirft, beschäftigt sich diese Dissertation anhand verschiedener präklinischer und klinischer Projekte mit dem Aspekt der VEGF-Inhibition im Rahmen der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie.

In der nachfolgenden Einleitung werden die unterschiedlichen Themen, die diese Dissertation behandelt, sowie weitere Bereiche, die zum besseren Verständnis der Arbeit beitragen, eingeführt.

## 1.1 Pränatale Entwicklung unter besonderer Betrachtung des Auges

Für die Einführung zur Pränatalen Entwicklung wurde, soweit nicht anders angegeben, das Buch „Medizinische Embryologie“ (2) verwendet.

### 1.1.1 Allgemeine Entwicklung

Pränatal lässt sich die Entwicklung des Menschen in drei Phasen unterteilen: die Blastogenese, die Embryogenese und die Fetogenese. Während der ersten Phase, der Blastogenese, entwickelt sich nach Befruchtung der Eizelle durch das Spermium durch wiederholte Zellteilungen die Blastozyste. Diese nistet sich um den 6. Tag nach Befruchtung in die Gebärmutterschleimhaut ein. Es schließt sich die Embryogenese, auch Organogenese genannt, von Tag 19 bis Tag 56, an. Hierbei beginnen die Zellen der Blastozyste zuerst sich in zwei Lagen anzuordnen und das spätere innere und äußere Keimblatt (Entoderm und Ektoderm) zu bilden. Zellen aus dem Ektoderm wandern über den Primitivstreifen (eine Verdickung des Ektoderms mit dem rundlichen Primitivknoten am Ende) nach unten und bilden zwischen Ektoderm und Entoderm, als neue Zellschicht, das mittlere Keimblatt, das Mesoderm. Zwischen der 4. und 8. Schwangerschaftswoche bilden sich die Organe und Extremitäten vollständig aus: Aus dem Entoderm entstehen die Epithelien verschiedener Organe wie z.B. des Verdauungs- und Atmungstrakts. Aus dem Ektoderm bildet sich zunächst die Neuralplatte, welche später zum Neuralrohr wird. Die ersten Augenanlagen finden sich bereits in diesem Stadium (siehe auch Abschnitt 1.1.3). Das Ektoderm bildet unter anderem Teile der Haut, der Augen, sowie des Nervensystems aus. Aus dem Mesoderm entstehen neben anderen Strukturen die Knochen, das Herz, die Blutgefäße und die Skelett Muskulatur. Während

## Einleitung

der letzten Phase der Schwangerschaft, der Fetogenese, welche sich bis zur Geburt erstreckt, erfolgen verstärktes Wachstum und Differenzierung der Organe. Diverse Wachstumsfaktoren, u.a. FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), Angiopoetine, TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), Semaphorine und VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) sind an diesen Vorgängen beteiligt (3). Beispielsweise spielen Faktoren der FGF-Familie, neben anderen Faktoren, eine wichtige Rolle bei Prozessen der Organogenese (besonders bei der Entwicklung der Lunge (4)), Angiopoetine beim Umbau der Gefäßwände und der Verstärkung dieser (5), TGF- $\beta$  ist von Bedeutung für die Blutgefäßbildung (6, 7) und Semaphorine für die Lymphgefäßbildung (8). VEGF wirkt unter anderem autokrin auf Endothelzellen und ist damit am Gefäßwachstum beteiligt (9) (zusammengefasst im Review von Crivellato *et al.* (3)). Im Folgenden wird aufgrund seiner Rolle an der Entwicklung der Frühgeborenenretinopathie, der Behandlungsmöglichkeit der Erkrankung durch die VEGF-Inhibition und der nicht bekannten systemischen Auswirkungen dieser Therapieform, besonders auf die Funktionen des Wachstumsfaktors VEGF-A in der prä- und postnatalen Entwicklung eingegangen.

### 1.1.2 Rolle von VEGF-A in der prä- und postnatalen Entwicklung

Wenn in der Literatur von VEGF gesprochen wird, ist meist die Rede von VEGF-A, welches aufgrund seiner Eigenschaft die Gefäßpermeabilität zu erhöhen, zuerst als VPF, Vascular Permeability Factor, beschrieben wurde (10). Zur selben Genfamilie gehören beim Menschen auch VEGF-B, -C und -D, sowie PlGF (Placental Growth Factor) (11). VEGF-A nimmt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Blutgefäßen ein (12). Durch alternatives Splicing entstehen beim Menschen aus *vegfa* Proteine mit unterschiedlicher Anzahl an Aminosäuren (13), wobei VEGF-A<sub>165</sub> am häufigsten vorkommt (12). Trotz nur geringer Unterschiede haben diese Splice-Varianten unterschiedliche Funktionen und Aktivitäten, z.B. auch bei der Entwicklung des retinalen Gefäßnetzes (14). VEGF-A bindet an zwei Tyrosinkinasen, die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (VEGFR-1 und -2), die sowohl membranständig als auch als lösliche Rezeptoren vorkommen (12). Eine Bindung von VEGF-A an den VEGFR-1 löst kein intrazelluläres Signal aus. Er fungiert somit hauptsächlich als Decoy-Rezeptor (15), an den VEGF-A mit deutlich höherer Affinität bindet als an den VEGFR-2 ( $K_d=15$  pm vs. 750 pm) (16). Er hat eine wichtige regulierende Funktion der Gefäßbildung in der Embryogenese, so sind beispielsweise Mäuse, die keinen VEGFR-1 exprimieren, nicht lebensfähig und zeigen eine vermehrte Proliferation, sowie ein desorganisiertes und nicht funktionsfähiges Gefäßsystem (17). Die Bindung von VEGF-A an den VEGFR-2 induziert dagegen Proliferation (über den PKC oder den Ras-Raf-MAPK-ERK Signalweg), Migration (p38 MAPK Signalweg), Zellmotilität (über PIP<sub>3</sub>), Zellüberleben (Aktivierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und A1), sowie



Erhöhung der Permeabilität (über die endotheliale NO-Synthase) und damit insgesamt Gefäßentwicklung bzw. Angiogenese (18, 19) (die VEGF Signalkaskade wird in Kapitel 1.3.1.4 genauer beschrieben) (PKC: Proteinkinase C; Ras: rat sarcoma, Raf: rat fibrosarcoma, beides Rho-GTPasen; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; PIP<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat; Bcl-2: B-cell lymphoma 2). Der VEGFR-2 wird hauptsächlich auf vaskulären Endothelzellen während der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese exprimiert, jedoch auch im Zusammenhang mit physiologischer Angiogenese im Reproduktionszyklus und der Wundheilung, sowie bei pathologischen Prozessen wie der Entstehung von Tumoren und proliferativer Retinopathie (12). Die Wirkung von VEGF-A<sub>165</sub> wird verstärkt durch eine Bindung an den Ko-Rezeptor Neuropilin 1 (20). Die VEGF-A-Ausschüttung wird hauptsächlich getriggert durch eine Gewebehypoxie und den dadurch induzierten Faktoren wie HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible-Factor-1 $\alpha$ ) (21). (Zusammengefasst nach Koch *et al.* (18), Ferrara *et al.* (12) und Ferrara (22))

Zu den Effekten von VEGF in der Schwangerschaft: Bereits wenige Tage nach der Einnistung in die Gebärmutterschleimhaut beginnt der Throphoblast (die äußere Schicht der Blastozyste) VEGF mRNA zu bilden, was auf eine Rolle von VEGF bei der Gefäßbildung in der Gebärmutterschleimhaut und Plazenta hinweist (23). Im Uterus kommt es zur Vasodilatation, erhöhter Permeabilität der Gefäße, sowie zum Wachstum von neuen Gefäßen, um die Versorgung der Blastozyste sicher zu stellen. Ab der 3. Woche entsteht bereits ein erstes Gefäßsystem, da Diffusion allein nicht mehr ausreicht (2). Neben VEGF sind an dieser Entwicklung auch andere Wachstumsfaktoren, wie FGF und Angiopoetine, auf die hier nicht näher eingegangen wird, beteiligt (24).

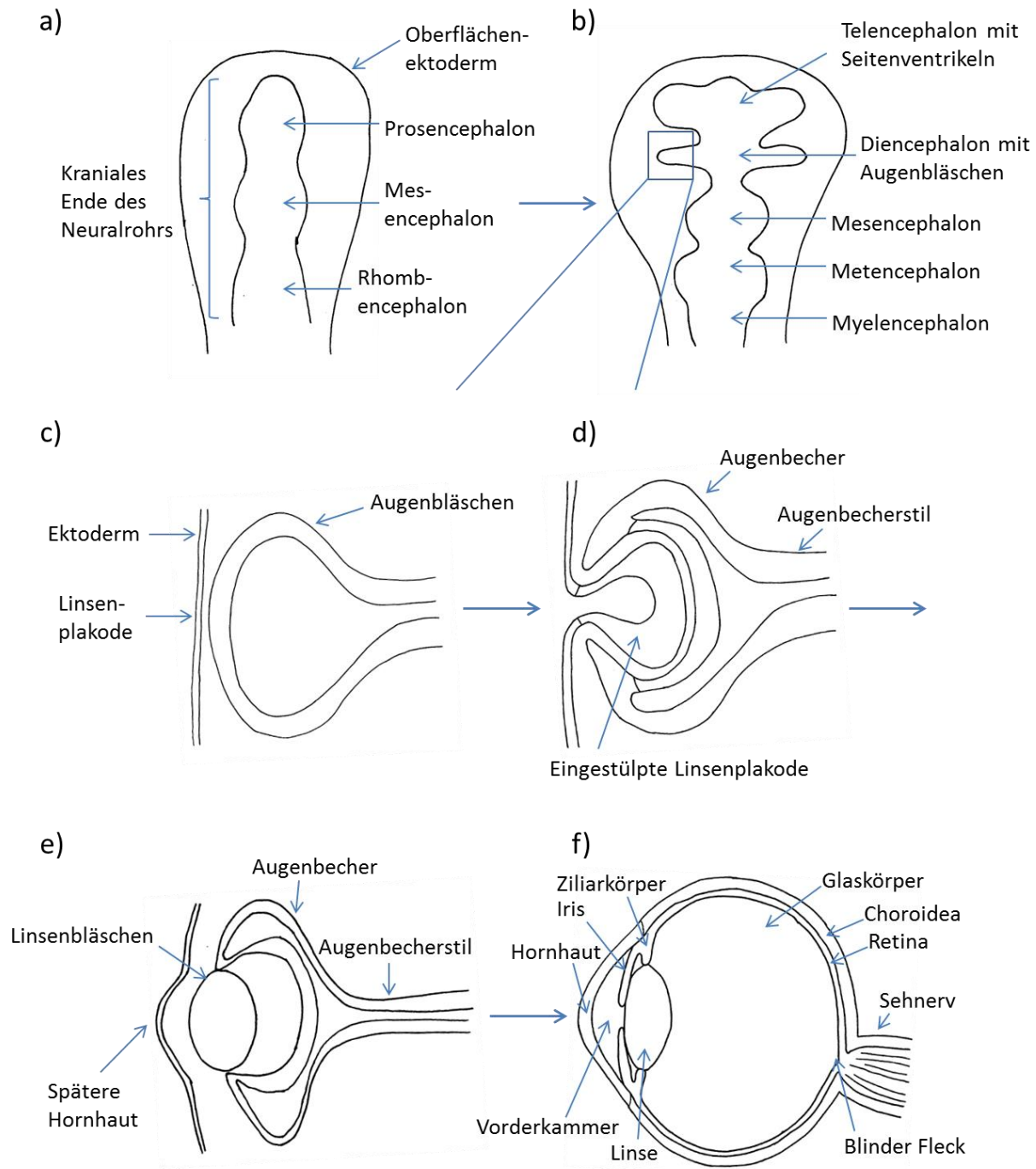
Prinzipiell sind zwei Vorgänge, die zur Bildung von Gefäßen beitragen können, zu unterscheiden: die Vaskulogenese und die Angiogenese (25) (siehe hierzu auch Abschnitt 1.3.1.3). Unter der Vaskulogenese versteht man die Neubildung von Gefäßen aus Angioblasten (Vorläuferzellen von Gefäßendothelzellen), weshalb dieser Vorgang primär zu Beginn der Embryonalentwicklung von Relevanz ist. Als Angiogenese bezeichnet man die Gefäßentstehung aus bereits vorhandenen Gefäßen durch Sprossung oder Spaltung. Auch sie kommt physiologisch in der embryonalen Entwicklung, sowie z.B. in der Wundheilung oder dem Reproduktionszyklus der Frau vor, jedoch auch pathologisch bei der Entstehung von Tumoren sowie bei proliferativen Augenerkrankungen (24). Die Ausbildung von Gefäßen, bzw. der Umbau bereits gebildeter primitiver Netzwerke in komplexe Gefäßsysteme ist während der gesamten embryonalen Entwicklung von Bedeutung (26). Des Weiteren ist VEGF-A an der Organogenese, also der Anlage der Organe von z.B. Gehirn, Lunge und Niere beteiligt (3). Am Mausmodell wurde zusätzlich festgestellt, dass auch eine

postnatale Hemmung von VEGF-A je nach Ausprägung zu erhöhter Mortalität, verringertem Körperwachstum und eingeschränkter Organentwicklung von Leber und Niere führt (27). Je später VEGF gehemmt wird, desto weniger wirkt sich dies auf die Entwicklung in der Maus aus (27). (Zusammengefasst nach Ferrara *et al.* (12))

### 1.1.3 Entstehung des Auges

Aus der oben bereits erwähnten dreischichtigen Struktur der Blastozyste entstehen erst die Neuralplatte, später das Neuralrohr. Am kranialen Ende des Neuralrohrs bilden sich das Prosencephalon, das Mesencephalon und das Rhombencephalon. Das Prosencephalon teilt sich in der weiteren Entwicklung in das Telencephalon mit den Seitenventrikeln und das Diencephalon mit den bereits angelegten Augenbläschen. Durch Induktion durch die Augenbläschen verdickt sich das darüber liegende Ektoderm und bildet die Linsenplakode, welche sich später vom Ektoderm als Linsenbläschen abtrennt und in den sich bildenden Augenbecher einwandert. Das darüber liegende Ektoderm bildet später einen Teil der Hornhaut. Der obere Rand des Augenbechers bildet die spätere Pupille. Die Versorgung des gesamten Auges während der Entwicklung übernimmt die Arteria hyaloidea, welche durch den Augenbecherspalt in das Auge gelangt und später zur Arteria retinae wird (siehe auch 1.1.4; in Abbildung 1 nicht dargestellt). Der Augenbecherspalt verschließt sich im weiteren Verlauf. Eine Übersicht der Entstehung des Auges zeigt Abbildung 1.

Die zukünftigen Lider stülpen sich als zwei Hautfalten über die Augen und verkleben. Erst im 7. Monat trennen sich die Augenlider wieder. Die Ader- und Lederhaut, sowie die Augenmuskeln bilden sich aus dem, den Augenbecher umgebenden, Mesenchym. Die äußere Wand des Augenbechers dagegen entwickelt sich zum retinalen Pigmentepithel, das vordere Fünftel der inneren Wand zur Pars caeca retinae (später an der Bildung von Iris und Ziliarkörper beteiligt) und der hintere Teil zur Pars optica. Den Übergang von der Pars optica zur Pars caeca nennt man Ora serrata. In der Pars optica kommt es zur Bildung zweier Schichten, der Ventrikulärzone, die an den Sehventrikel angrenzt und der Marginalzone, die nach innen gerichtet ist. Der Sehventrikel schließt sich im Verlauf, sodass der innere Teil des Augenbechers (die spätere Netzhaut) direkt auf dem äußeren Rand des Augenbechers (das spätere RPE) aufliegt. Dies ist auch der Grund, weshalb es bei der Frühgeborenenretinopathie und bei anderen proliferativen Erkrankungen relativ leicht zu einer Netzhautablösung kommt.

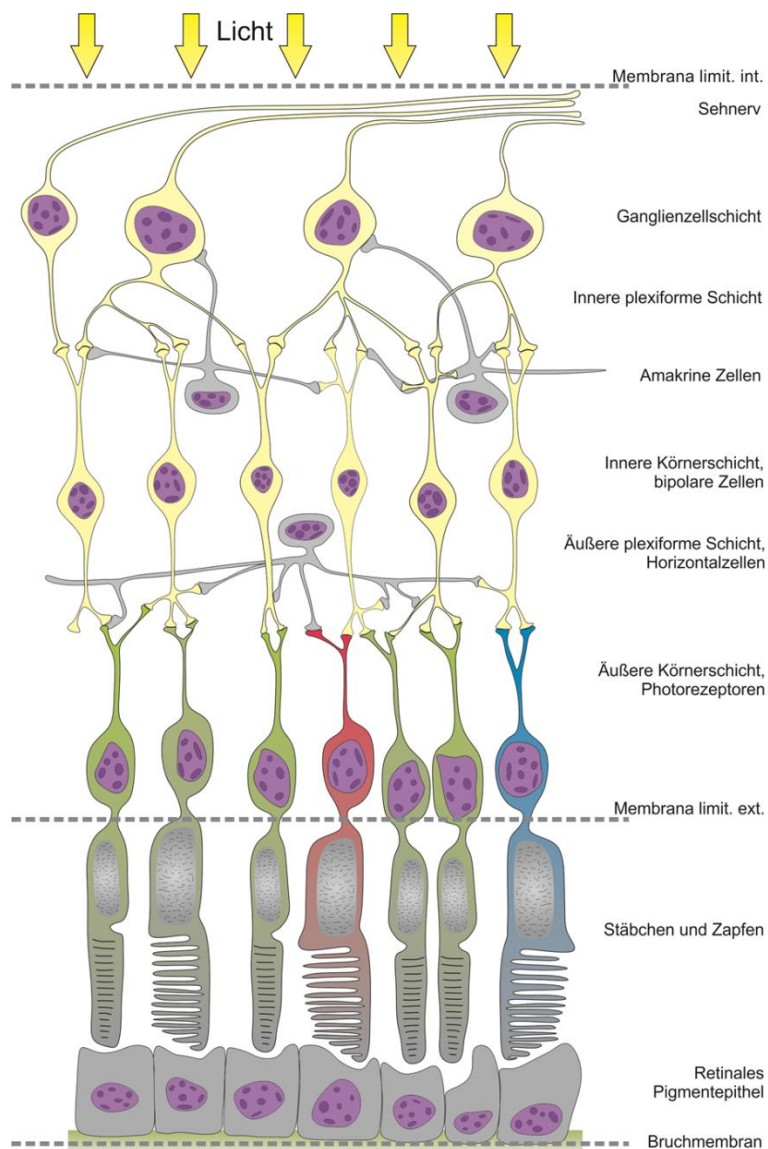


**Abbildung 1:** Schematische Übersicht über die embryonale Entwicklung des Auges (nach Kühl und Gessert (28)) a) kraniales Ende des Neuralrohrs, aus dem sich das Gehirn und als Ausstülpung daraus auch die Augen entwickeln. b) Das Prosencephalon unterteilt sich in das Telencephalon und das Diencephalon mit den bereits angelegten Augenbläschen. Die Abbildungen c-e stellen vergrößert die Vorgänge in der Ausstülpung des Diencephalons dar; c) das Augenbläschen induziert im darüber liegenden Ektoderm die Bildung der Linsenplakode; d) die Linsenplakode stülpt sich in den sich bildenden Augenbecher ein; e) die eingestülpte Linsenplakode hat sich zum Linsenbläschen abgeschnürt und bildet später die Linse. Das darüber liegende Ektoderm wird später zu einem Teil der Hornhaut. Über den Augenbecherspalt wandert die Arteria hyaloidea in das Auge ein und versorgt die Linse während der Entwicklung des Auges. Später wird die A. hyaloidea zur A. retinae; f) schematische Darstellung des entwickelten Auges.

## Einleitung

Die aus der Ventrikulärzone stammenden Proneurone wandern in die Marginalzone ein und bilden dort als erste Schicht die Ganglienzellschicht. Ihre Axone konvergieren auf der Innenseite des Augenbechers und ziehen durch den Augenbecherstil, der damit zum Nervus opticus wird, zum Gehirn. Die Zellen in der Ventrikulärzone bilden außerdem die innere und äußere Körnerschicht mit den Bipolarzellen und den Photorezeptoren, die an der, dem ehemaligen Ventrikel zugewandten Seite zu Stäbchen und Zapfen und damit zu den lichtsensiblen Strukturen des Auges differenzieren (Zusammengefasst nach dem „Kurzlehrbuch der Embryologie“ von Ulfing (29), sowie nach dem Buch „Entwicklungsbiologie“ von Kühl und Gessert (28)).

Eine Übersicht über die Schichten der Retina ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau der Retina nach G.K. Lang (30); mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jessica Vögeler (31)

### 1.1.4 Aufbau und Entwicklung des Gefäßnetzes des Auges

Das Auge wird beim erwachsenen Menschen von zwei Gefäßnetzen versorgt: Dem chorioidalen und dem retinalen Netzwerk. In der embryonalen Entwicklung entsteht jedoch zuerst das hyaloidale Gefäßnetz, welches für die Versorgung der sich entwickelnden Linse sorgt und sich im Verlauf wieder zurück bildet. Durch den Augenbecherspalt gelangt die Arteria hyaloidea von hinten in das Auge und wächst durch den primitiven Glaskörper in Richtung Linse. Hier bildet sie am hinteren Pol die Tunica vasculosa lentis (TVL) und am vorderen Pol der Linse die Pupillarmembran. Der Wachstumsfaktor VEGF-A gilt als Trigger für die Bildung der TVL sowie der Pupillarmembran (32). Das hyaloidale Gefäßnetz beginnt sich zurück zu bilden, sobald das retinale Gefäßnetz aufgrund des gesteigerten Metabolismus der neuronalen Netzhaut anfängt, sich zu bilden (14). Bei Termingeborenen ist die TVL im Normalfall nicht mehr sichtbar, während sie bei Frühgeborenen zum Teil noch erkennbar und ein Zeichen für die Unreife des Auges ist (33).

Parallel zur Ausbildung des hyaloidalen Gefäßnetzes bildet sich aus Zellen des Mesenchyms, welches den Augenbecher umgibt, ein primitives chorioidales Netzwerk. Dieses wird im 2. und 3. Monat in ein komplexes Gefäßnetz umgestaltet. Das retinale Pigmentepithel (RPE), welches eine Barriere zur neuronalen Retina darstellt, ist aufgrund der Produktion von Wachstumsfaktoren für die Bildung der Chorioidea essentiell (14). Aufgrund der Dicke der Netzhaut reicht eine Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen aus der Chorioidea für die Versorgung mit der Zeit nicht mehr aus (34), weshalb sich ein oberflächlicher, ein intermediärer und ein tiefer retinaler Gefäßplexus bilden, die zusammen die Versorgung der inneren Retina übernehmen. Zuerst entwickelt sich der oberflächliche Plexus beginnend mit der 14. Woche ausgehend vom Sehnervenkopf in die Peripherie. Getriggert wird dies durch den erhöhten Metabolismus der neuronalen Zellen der Netzhaut und der daraus resultierenden „physiologischen Hypoxie“ (35). Später (ca. ab der 24. Woche) wachsen von diesem oberflächlichen Plexus Gefäße in Richtung RPE und formen den tiefen Plexus an der Grenze zwischen der inneren und äußeren plexiformen Schicht, sowie den intermediären Plexus an der zum Auginneninneren gerichteten Seite der inneren plexiformen Schicht (siehe auch Abbildung 2). Der oberflächliche Gefäßplexus erreicht etwa in der 36. Schwangerschaftswoche auf nasaler Seite die Ora serrata, auf temporaler Seite erst mit ca. 40 Wochen, die Entwicklung des tiefen und des intermediären Gefäßplexus erstreckt sich bis nach der regulären Geburt. An diesen Vorgängen sind Astrozyten in der Ganglienzellschicht und Müllerzellen in der tiefen Retina durch Produktion von VEGF beteiligt (36). (Zusammengefasst nach den Reviews von Saint-Geniez und D'Amore (14), sowie Gariano (37))

### 1.2 Frühgeborenenretinopathie

#### 1.2.1 Frühgeburt und mögliche Folgekomplikationen

In diesem Kapitel wurden, soweit nicht anders angegeben, die Bücher „Pädiatrie“ (38) und „Neonatologie“ (39) als Quellen verwendet.

Kinder, die vor der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche (gerechnet wird hier ab dem ersten Tag der letzten Periode) geboren werden, bezeichnet man als Frühgeborene. Als Risikofaktoren für eine Frühgeburt gelten z.B. genetische Faktoren (ethnische Unterschiede, familiäre Häufung), Infektionen, Stress, Mehrlingsschwangerschaften, Fehlbildungen und das Alter der Mutter, wobei die Ursachen noch nicht abschließend geklärt sind. In Deutschland sind nach Zahlen aus dem „European perinatal health report“ aus dem Jahr 2010 ca. 8 % aller Geburten eine Frühgeburt (40). Es wird nach Geburtsgewicht noch einmal unterschieden in die Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 2500 g (low birthweight infants; LBW), die Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g (very low birthweight infants; VLBW) und die Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1000 g (extremely low birthweight infants; ELBW). Alle Kinder, die als VLBW oder ELBW Kinder zur Welt kommen, werden automatisch in das Screening auf Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie aufgenommen, die Kinder mit einem höheren Geburtsgewicht nur dann, wenn sie einen auffälligen klinischen Verlauf zeigen und z.B. mehr als drei Tage Sauerstoffsupplementation erhalten oder vor der 32. Schwangerschaftswoche geboren werden (41). Im Folgenden wird daher besonders auf die gesundheitlichen Probleme der VLBW und ELBW Kinder eingegangen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Komplikationen, welche im Zusammenhang mit einer Frühgeburt stehen, unterteilt in akute Probleme und daraus resultierende chronische Probleme.

**Tabelle 1:** Übersicht über die wichtigsten gesundheitlichen Komplikationen im Zusammenhang mit der Frühgeburt

Akute Probleme	Chronische Probleme
<ul style="list-style-type: none"><li>• Atemnotsyndrom, Apnoe-Phasen</li><li>• Frühgeborenenretinopathie</li><li>• Persistierender Ductus arteriosus</li><li>• Arterielle Hypotonie</li><li>• Pulmonale Hypertonie</li><li>• Nekrotisierende Enterokolitis</li><li>• Gehirnblutungen</li><li>• Periventrikuläre Leukomalazie</li><li>• Hydrocephalus</li><li>• Infektionen</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bronchopulmonale Dysplasie</li><li>• Sehbehinderung, Myopie, teilweise Erblindung</li><li>• Pulmonale und arterielle Hypertonie</li><li>• Zerebralparese</li><li>• Taubheit</li><li>• Neurokognitive Langzeitfolgen</li></ul>

Durch eine verbesserte postpartale neonatologische Versorgung überleben mittlerweile auch sehr früh geborene Kinder mit weniger gesundheitlichen Problemen, wie unter anderem Daten aus Frankreich zeigen, in denen eine Population aus 1997 mit Kindern aus 2011 verglichen wurde. In dieser Studie war die Anzahl an Kindern, die ohne schwere Morbiditäten aus dem Krankenhaus entlassen wurden, deutlich angestiegen (42). Dennoch beschreibt Jarjour für Kinder, die mit 22 und 23 Wochen geboren werden, in seinem Review von Daten zwischen 1999 und 2013 (43), nur geringe Chancen ( $< 5\%$ ), ohne oder mit nur leichten Beeinträchtigungen zu überleben. Für Kinder, die bis zur 25. Woche geboren werden, läge die Wahrscheinlichkeit dafür bei 6-20 % der Lebendgeburten. Bei den Beeinträchtigungen handelt es sich unter anderem um Lernbehinderungen (bei ca. 5-36 %), Zerebralparese (9-18 %), Blindheit (0,7-9 %) und Taubheit (2-4 %) (43).

### **1.2.2 Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland**

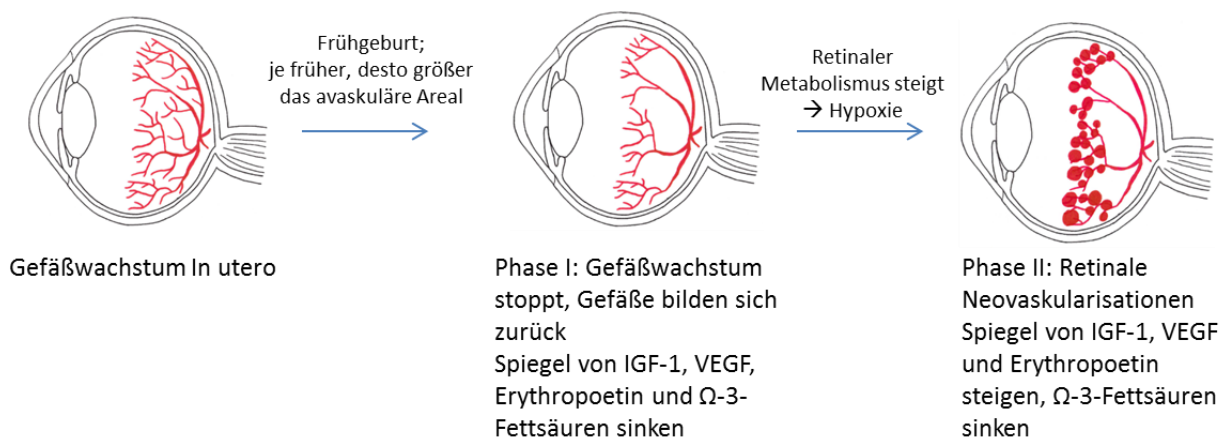
Etwa 10 % aller Geburten weltweit sind Kinder, die vor der vollendeten 37. Woche zur Welt kommen und somit per definitionem Frühgeborene (44). Allerdings besteht nur bei einem kleinen Teil der Patienten ein Risiko, an einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie zu erkranken. Hierbei existiert eine eindeutige Korrelation zwischen Gestationsalter bei Geburt und dem Risiko für eine Frühgeborenenretinopathie. In einer schwedischen Kohorte zeigten 73 % der Kinder mit einem Geburtsalter von weniger als 27 Wochen eine Frühgeborenenretinopathie, die allerdings nur bei 19,6 % der Kinder behandlungsbedürftig wurde. In dieser Studie wurden nur die Kinder herangezogen, die unter 27 Wochen Gestationsalter zur Welt gekommen waren, bei denen das Risiko, eine behandlungsbedürftige Frühgeborenenretinopathie zu entwickeln, deutlich erhöht ist, was die sehr hohe Behandlungsrate erklärt (45). So zeigen neuere Daten aus dem Schwedischen ROP Register (SWEDROP), die sich auf alle Screening Fälle beziehen, dass hier nur bei 5,2 % eine Behandlung nötig war (46). In Deutschland liegt die Inzidenzrate der behandelten Fälle unter den Screening Fällen derzeit bei nur 3,2 % (47). Damit ergeben sich jährlich nur ca. 400-600 behandlungsbedürftige Fälle einer Frühgeborenenretinopathie in Deutschland (48).

### **1.2.3 Pathophysiologie der Erkrankung**

Durch die zu frühe Geburt wird die physiologische Entwicklung des Gefäßnetzes des Auges (siehe Kapitel 1.1.4) unterbrochen. Je früher die Geburt erfolgt, desto unreifer ist dabei die Netzhaut. Die avaskuläre Zone ist somit größer und damit steigt auch das Risiko, eine schwere Form der Frühgeborenenretinopathie zu entwickeln. Im Vergleich zum Uterus herrscht an der Raumluft ein deutlich höherer

## Einleitung

Sauerstoffpartialdruck (30 mmHg vs. 60-100 mmHg (49)). Zusätzlich benötigen viele Frühgeborenen aufgrund einer Lungenunreife eine Beatmung mit Sauerstoff (siehe hierzu auch „Neonatalogie. Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen“ (39)). Das vermehrte Sauerstoffangebot führt zur Verhinderung der „physiologischen Hypoxie“, welche bei normal ablaufender Vaskularisierung der Netzhaut durch den gesteigerten Metabolismus der neuronalen Zellen erzeugt würde (35). Die Ausschüttung von HIF-1 $\alpha$  wird dadurch unterdrückt und es werden keine weiteren Gefäße mehr ausgebildet. Die bereits vorhandenen Gefäße werden zum Teil sogar wieder zurückgebildet, sodass sich insgesamt die avaskuläre Zone noch vergrößert (50, 51). Durch den plötzlichen Wegfall der Versorgung über die Mutter sinken im Blutkreislauf des Kindes außerdem die Spiegel an IGF-1 (Insulin like growth factor-1), VEGF, Erythropoetin und an  $\Omega$ -3-Fettsäuren (52). Diese Phase nennt man auch die I. Phase der Frühgeborenenretinopathie. In der II. Phase nimmt der Metabolismus der neuronalen Zellen der Netzhaut zu (53). Der dadurch entstehende Bedarf an Sauerstoff und Nährstoffen kann aufgrund der Regression von Gefäßen in der I. Phase nicht gedeckt werden, es kommt zur Hypoxie, die wiederum zur vermehrten Bildung von IGF-1, VEGF und Erythropoetin führt und damit die Angiogenese triggert. Es kommt zum Überschießen des Gefäßwachstums und damit zur Ausbildung des Krankheitsbilds der Frühgeborenenretinopathie. Eine Übersicht über die Krankheitsentstehung ist in Abbildung 3 dargestellt. (Zusammengefasst nach den Review Arbeiten von Smith *et al.* (54) und Hellström *et al.* (55))

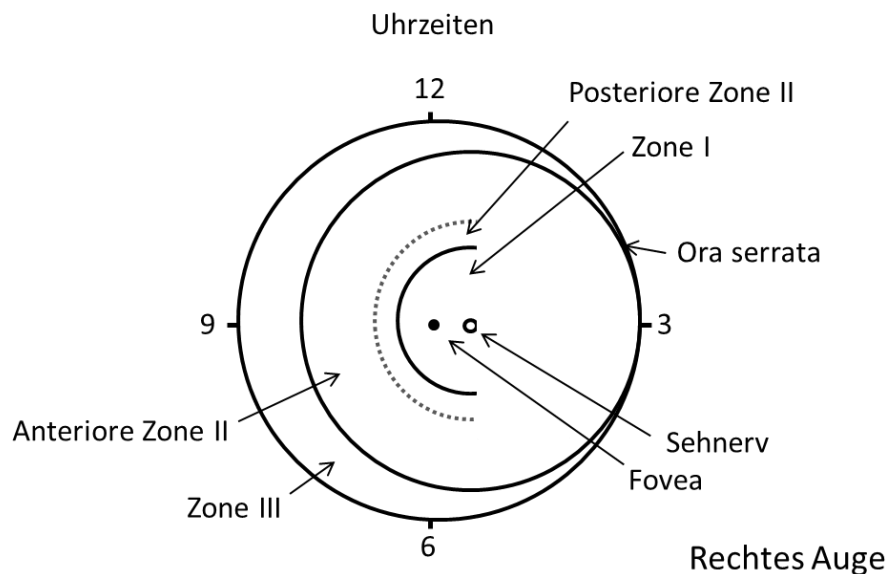


**Abbildung 3:** Übersicht zur Krankheitsentstehung der Frühgeborenenretinopathie nach Smith *et al.* (54)

Die Frühgeborenenretinopathie wird nach der ICROP Klassifikation (International Classification of Retinopathy of Prematurity) in verschiedene Stadien und drei Zonen eingeteilt (56). Ein Kreis mit dem Durchmesser doppelter Abstand Sehnerv-Fovea um den Sehnerv herum begrenzt die Zone I. Die Zone II ist ein Kreis um den Sehnerv mit dem Radius Sehnerv-Ora serrata (auf nasaler Seite). Diese Zone wird

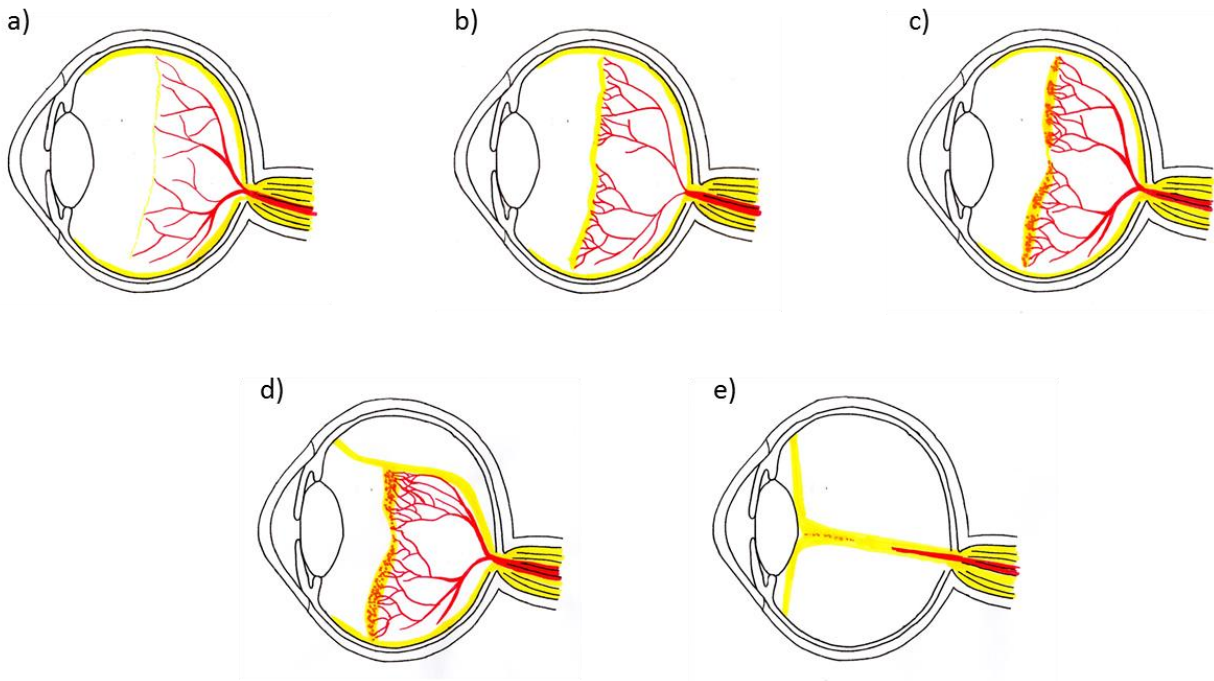


noch einmal unterteilt in den posterioren und den anterioren Bereich. Der posteriore Bereich wird begrenzt durch den dreifachen Abstand Sehnerv-Fovea. Die restliche Retina außerhalb der Zone II bezeichnet man als Zone III. Das Auge wird außerdem in 12 Sektoren, die Uhrzeiten, unterteilt, um die Ausbreitung der Erkrankung quantifizieren zu können. Die Zoneneinteilung sowie die Uhrzeiten sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt.



**Abbildung 4:** Einteilung des Auges in Zonen und Uhrzeiten bei der Frühgeborenenretinopathie Zone I: Kreis mit Radius entsprechend dem doppelten Abstand Sehnerv und Fovea um den Sehnerv; posteriore Zone II: Kreis mit Radius dreifacher Abstand Sehnerv-Fovea um den Sehnerv; anteriore Zone II: Restlicher Teil der Zone II (Kreis um Sehnerv mit Radius Sehnerv-Ora serrata auf nasaler Seite); Zone III: Restlicher Teil der Retina außerhalb der Zone II.

Des Weiteren wird die Frühgeborenenretinopathie in Stadien nach ihrer Ausprägung unterteilt. Stadium 1 bezeichnet das Vorhandensein einer Vaskularisationsgrenze, auch Demarkationslinie genannt. Im Stadium 2 ist eine prominente Leiste (engl. Ridge) an der Grenze zwischen vaskularisierter und avaskulärer Netzhaut sichtbar. Extraretinale Proliferationen auf der Leiste sind im Stadium 3 zu erkennen. Beim Stadium 4a kommt es zur partiellen Netzhautablösung (Ablatio retinae) ohne Fovea Beteiligung, bei 4b mit Fovea Beteiligung. Eine vollständige Ablatio retinae wird als Stadium 5 bezeichnet. Die Plus disease ist ein Zeichen einer besonders aggressiven Form der Frühgeborenenretinopathie. Erkennbar ist sie durch geweitete Gefäße am hinteren Pol, welche eine besonders starke Tortuositas („Schlängelung“) zeigen. Die einzelnen Stadien sind in Abbildung 5 dargestellt. Als Aggressive posteriore ROP (AP-ROP) bezeichnet man eine besonders rasch voranschreitende Form der Erkrankung, die mit ausgeprägter Tortuositas einhergeht.



**Abbildung 5:** Darstellungen der verschiedenen Stadien der Frühgeborenenretinopathie (nach Hellstrom *et al.* (55)); a) Stadium 1: Demarkationslinie, Grenze zwischen vaskularisierter und avaskulärer Netzhaut; b) Stadium 2: Leiste, prominenter Wall an der Grenze; c) Stadium 3: extraretinale Proliferationen; d) Stadium 4: partielle Ablatio retinae; e) Stadium 5: vollständige Ablatio retinae

### 1.2.4 Geschichte der Behandlung und Prävention der Frühgeborenenretinopathie

1942 beschrieb Terry (1) erstmals eine Augenerkrankung, die sich durch eine weiße Masse hinter der Linse darstellte und nannte diese Erkrankung „Retrolentale Fibroplasie“, mittlerweile bekannt als Frühgeborenenretinopathie, im Englischen Retinopathy of Prematurity, kurz ROP. Anfang der 50er Jahre wurde der Zusammenhang zwischen dem damals üblichen intensiven Sauerstoffeinsatz im Inkubator und dem Auftreten der Erkrankung anhand von Tiermodellen erkannt (50). Als Folge wurde der Einsatz von Sauerstoff reduziert, was zwar zu einer Reduktion der Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie, jedoch auch zu einem Anstieg der Mortalität führte (57). Es wurden verschiedene Studien durchgeführt, die sich mit der Frage nach dem richtigen Sauerstoffregime befassten, welches das Auftreten der Frühgeborenenretinopathie minimieren und gleichzeitig keinen negativen Effekt auf die Gehirnentwicklung, sowie eine chronische Lungenerkrankung aufweisen soll. Bis heute ist noch kein Übereinkommen über ein geeignetes Sauerstoffregime gefunden worden (58).

Als erste therapeutische Studie zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie wurde die CRYO-ROP Studie ab 1986 durchgeführt. Hierbei wurde ein Auge, welches „Threshold disease“ aufwies (definiert als Stadium 3+ Erkrankung in Zone I oder II in mind. fünf zusammenhängenden oder acht unzusammen-

hängenden Uhrzeiten), mittels transskleraler Kryokoagulation behandelt, während das andere Auge des Kindes als Kontrolle diente und unbehandelt blieb. Unilateral betroffene Kinder wurden in einen der beiden Studienarme (Kryokoagulation oder keine Behandlung) randomisiert. Bereits die vorläufigen drei-Monatsdaten zeigten eine deutliche Reduktion des Auftretens eines ungünstigen Ausgangs (definiert als posteriore Retinaablösung, Retinafalten, die die Makula betreffen oder retrolentales Gewebe) auf 21,8 % in den mittels Kryotherapie behandelten Augen im Vergleich zu 43 % in den unbehandelten Partneraugen (59) und konnten in weiteren Auswertungen bestätigt werden (60-62).

Die Einführung der Laserkoagulation brachte in den Folgejahren eine weitere Verbesserung. Eine prospektive randomisierte Studie zeigte, dass diese Behandlungsmethode mindestens genauso effektiv wie die Kryokoagulation ist (63), wobei damit deutlich bessere funktionelle Langzeitergebnisse erreicht werden, als unter Kryotherapie (64-67).

Den nächsten Meilenstein in der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie stellt die ETROP Studie dar, in welcher in einer Gruppe die Augen bereits in einem „high-risk prethreshold“ Stadium behandelt wurden, während in der anderen Gruppe die Augen erst bei Erreichen des Threshold Stadiums meist mittels Laserkoagulation oder alternativ mittels Kryokoagulation behandelt wurden (68). Das „high-risk prethreshold“ Stadium wurde definiert als jedes Stadium einer Frühgeborenenretinopathie in Zone I und als Stadium 2+, 3- und 3+ in Zone II jedoch mit weniger betroffenen Uhrzeiten als im Threshold Stadium; das Risiko wurde über einen Risikokalkulator, basierend auf den Erkenntnissen aus der CRYO-ROP Studie, berechnet. Als Threshold Stadium wurde, wie in der CRYO-ROP Studie, eine Erkrankung in Zone I oder II mit Stadium 3+ über mindestens fünf zusammenhängende oder acht unzusammenhängende Uhrzeiten definiert (68). Die Ergebnisse zeigten, dass eine frühere Behandlung zu deutlich weniger ungünstigen Visusergebnissen führt als eine späte Behandlung, sowie zu seltenerem Auftreten von negativen strukturellen Ergebnissen nach neun Monaten (69). Basierend auf den Ergebnissen der ETROP Studie wurde die Erkrankung neu eingeteilt und eine Typ 1 ROP definiert, für welche eine Koagulationstherapie als sinnvoll erachtet wird: Zone I, jedes Stadium mit Plus Disease und Stadium 3 auch ohne Plus Disease, sowie Zone II Stadium 2 oder 3 mit Plus Disease. Dagegen zeigten die Ergebnisse, dass bei einer Typ 2 ROP (Zone I Stadium 1- oder 2-, sowie Zone II Stadium 3-) noch zugewartet werden kann und erst behandelt werden sollte, wenn eine Typ 1 ROP oder ein „Threshold“ Stadium entsteht (69). Die positiven kurzfristigen Ergebnisse der Behandlung von Typ 1 ROP konnten durch die Langzeitergebnisse bestätigt werden (70, 71). Dennoch hatten zwei Drittel der früh behandelten Kinder im Alter von ca. 6 Jahren nur einen Visus von 20/40 oder schlechter (70), was zeigt, dass es sich dabei noch nicht um die ideale

## Einleitung

Behandlungsmethode handelt. Die Laserkoagulation hat die Kryokoagulation abgelöst und ist bis heute Standardtherapie bei der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie (47). Allerdings wird in beiden Verfahren der bis zu diesem Zeitpunkt avaskuläre Teil der Retina zerstört, was später zu Langzeit Komplikationen führen kann (72). Dies ist beim Einsatz von VEGF-Inhibitoren nicht der Fall.

Eine weitere große prospektive, randomisierte Studie stellt die BEAT-ROP Studie dar, in der der VEGF-Inhibitor Bevacizumab mit der Laserkoagulation verglichen wurde (73). Es konnten Kinder mit einem in beiden Augen vorliegenden Stadium 3+ in Zone I oder der posterioren Zone II in die Studie eingeschlossen werden. Es zeigte sich, dass in der Bevacizumab Gruppe nur 4 % eine erneute Behandlung benötigten, während in der Lasergruppe 22 % eine Reaktivierung der Erkrankung zeigten. Signifikant war dieser Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen für Zone I, jedoch nicht für Zone II. Eine große Differenz lag auch für die Zeit bis zur Wiederbehandlung vor (16,0 Wochen in der Bevacizumab Gruppe vs. 6,2 Wochen in der Lasergruppe) (73). Seit Veröffentlichung dieser Daten steigt die Anwendung von VEGF-Inhibitoren auch in Deutschland (47), obwohl sie weder von der EMA noch der FDA für die Behandlung einer Frühgeborenenretinopathie zugelassen sind.

Die CARE-ROP (Clinicaltrials.gov Identifier: NCT02134457) Studie ist eine weitere klinische Studie, in der jedoch Ranibizumab anstelle von Bevacizumab als VEGF-Inhibitor untersucht wurde. Bevor die CARE-ROP Studie im August 2014 in Deutschland startete, gab es nur vereinzelt Fallberichte über den Einsatz von Ranibizumab bei Frühgeborenen (74, 75). Die Planung und Betreuung der CARE-ROP Studie, in der zwei verschiedene Dosierungen von Ranibizumab verglichen werden, war Teil dieser Dissertation (siehe hierzu auch 4.1.2). Daten zur Kernstudie der CARE-ROP werden voraussichtlich am 08. Januar 2018 (ePub first) veröffentlicht (76). Im Dezember 2015 begann außerdem die internationale Phase III Zulassungsstudie RAINBOW (Clinicaltrials.gov Identifier: NCT02375971) zu Ranibizumab bei Frühgeborenenretinopathie, durchgeführt von Novartis Pharmaceuticals, in der zwei verschiedene Dosierungen des Medikaments (0,2 mg und 0,1 mg) sowie ein Laser Arm miteinander verglichen werden. Die Studie wird voraussichtlich Mitte 2018 erste Daten liefern.

Zusätzlich gibt es auch einige präventive Ansätze für die Frühgeborenenretinopathie. Wie unter 1.2.3 dargestellt, sinkt in der Phase I der Frühgeborenenretinopathie die systemische Konzentration von IGF-1 und Omega-3-Fettsäuren ab, da die mütterliche Versorgung wegfällt. In einer großen Studie wurden deshalb Kinder ab Geburt bis Woche 30 PMA (postmenstruelles Alter) mit dem Wirkstoff SHK607 (eine Kombination aus IGF-1 und IGFBP-3 (IGF Binding Protein-3)) einmal täglich behandelt (Clinicaltrials.gov

Identifiziert: NCT01096784). Primärer Endpunkt war der Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während keine Reduktion des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie erreicht wurde, scheint der Wirkstoff in Bezug auf einige der Sekundärparameter (Inzidenz der schweren bronchopulmonalen Dysplasie oder schwere Gehirnblutungen) wirksam zu sein (77). Auch der Einsatz von Fischöl, welches reich an  $\Omega$ -3-Fettsäuren ist, wird derzeit in einer prospektiven Studie zur Prävention von Frühgeborenenretinopathie untersucht (Clinicaltrials.gov Identifiziert: NCT02486042).

### 1.2.5 Diagnose und aktuelle Behandlungsoptionen inklusive Sicherheitsaspekte

Nach der aktuellen deutschen „Leitlinie zur augenärztlichen Screening Untersuchung von Frühgeborenen“ (41) werden alle Kinder, die vor der 32. Schwangerschaftswoche oder mit einem Geburtsgewicht von maximal 1500 g geboren werden, in das Frühgeborenenretinopathie Screening aufgenommen. Des Weiteren werden Frühgeborene auf die Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie hin untersucht, welche zwischen 32 und 36 Wochen postmenstruellen Alters zur Welt gekommen sind und postnatal mehr als drei Tage Sauerstoffsupplementation benötigten. Die erste Screening Untersuchung findet meist in der 6. postnatalen Woche statt, jedoch nicht vor der 31. Woche PMA. Je nach Schweregrad des Ausgangsbefunds bei der ersten Untersuchung erfolgt die Terminierung der darauf folgenden Untersuchungen (41). Auch in Schweden werden Kinder bis zu einem Gestationsalter von 31 (+6) Wochen regulär in das Frühgeborenenretinopathie Screening eingeschlossen (78), in Amerika dagegen nur bis 30 (+6) Wochen (79).

Da die Inzidenz der Behandlungsbedürftigkeit in der Gruppe der gescreenten Kinder nur sehr gering ist (derzeit in Deutschland ca. 3,2 % (47)) und außerdem die Screening Untersuchung, mit erheblichem Stress für die Frühgeborenen verbunden ist (80), gibt es einige Versuche, die Häufigkeit der Untersuchungen sowie die damit verbundenen Kosten und den Stress für die Frühgeborenen zu reduzieren. So basiert der WINROP-Algorithmus auf der Korrelation der postnatalen Gewichtsentwicklung mit der Entwicklung einer therapiebedürftigen Form der Frühgeborenenretinopathie. Erste Publikationen zeigten vielversprechende Sensitivitäts- und Spezifitätswerte auch für Populationen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund (81, 82). Eine Anpassung der Sauerstoffregime in den letzten Jahren führte jedoch dazu, dass die Entwicklung des Gewichts nach der Geburt nicht mehr so gut mit der Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie korreliert, weshalb der Algorithmus derzeit mit viel Vorsicht betrachtet werden muss (83).

## Einleitung

Wird bei der Fundus Untersuchung eine behandlungsbedürftige Form der Frühgeborenenretinopathie festgestellt, liefert die oben genannte Leitlinie sowie die „Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), der Retinologischen Gesellschaft (RG) und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands (BVA) zum Einsatz von Bevacizumab in der Therapie der Frühgeborenenretinopathie“ (84) Behandlungsempfehlungen. Basierend auf den Studienergebnissen der BEAT-ROP Studie wird die Bevacizumab Therapie für eine Erkrankung in Zone I, Stadium 1+, 2+ oder 3+/- als sinnvolle Alternative zur Laserkoagulationstherapie betrachtet. Bei einer Behandlungsbedürftigkeit in der peripheren Zone II wird die Laserkoagulationstherapie favorisiert. Für die zentrale Zone II werden die beiden Therapieoptionen als gleichwertig eingestuft. Das Fortschreiten der Erkrankung bis zum Stadium 4 oder 5 kann in den meisten Fällen durch frühzeitige Behandlung vermieden werden. Wenn es dennoch vorkommt, wird ein Stadium 4 oder 5 mittels operativer Techniken behandelt. Die Leitlinie spricht sich in diesen Stadien explizit gegen eine Behandlung durch Bevacizumab aus, da erste Fälle traktiver Vitreoretinopathien beschrieben sind (85, 86). Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Einteilung der Frühgeborenenretinopathie nach Behandlungsbedürftigkeit und die jeweiligen Behandlungsempfehlungen.

**Tabelle 2:** Übersicht über die Einteilung der Frühgeborenenretinopathie und die jeweils vorgeschlagene Therapieoption

Einteilung der Frühgeborenenretinopathie	Therapieempfehlung der Leitlinie
AP-ROP	Bevacizumab möglich, allerdings begrenzte Datenlage
Zone I, 1+, 2+, 3+/-	Bevacizumab scheint vorteilhaft; Alternative: Laserkoagulation
Periphere Zone II, 3+	Laserkoagulation
Zentrale Zone II, 3+	Laserkoagulation, in Ausnahmefällen Bevacizumab
Zone III	Keine Therapie erforderlich*
Stadium 4/5	VEGF-Inhibition nicht empfohlen (Behandlung meist mittels operativer Techniken)

\*in Zone III ist im Normalfall keine Therapie erforderlich, allerdings kann es Einzelfälle geben, in denen eine Behandlung in Zone III sinnvoll erscheint. Eine Entscheidung wird meist zusammen mit den Neonatologen und den Eltern getroffen.

Folgende Sicherheitsaspekte müssen für die VEGF-Inhibition sowie die Laserkoagulation beachtet werden: erste Fallberichte zeigen, dass die Gefäße nach Einsatz eines VEGF-Inhibitors, anders als nach Laser, zwar weiter in die Peripherie wachsen, die Morphologie jedoch nicht einer „normalen“ Gefäßentwicklung entspricht (87-89). Dennoch führt die VEGF-Inhibition zu einer deutlich weniger ausgeprägten Myopie als die Laserkoagulation (90, 91). Außerdem kann die Applikation von VEGF-

Inhibitoren zum Teil unter reiner Lokalanästhesie durchgeführt werden, während die Laserkoagulation fast immer in Vollnarkose erfolgt (47). Ein weiterer wichtiger Punkt, in dem sich die Laserkoagulation von der Behandlung mit VEGF-Inhibitoren unterscheidet, ist der Zeitpunkt des Auftretens von Rezidiven. Nach der Behandlung mit VEGF-Inhibitoren kommt es zum Teil erst nach mehreren Wochen oder sogar bis zu einem Jahr (92) zur Reaktivierung der Erkrankung, während eine Reaktivierung nach Laserkoagulation deutlich früher auftritt (93). Dies ist besonders für die Nachkontrollen nach einer Behandlung von großer Bedeutung und muss auch in die Bewertung der beiden Methoden einfließen.

Ein weiterer Punkt, der zu beachten ist, ist die systemische Belastung durch intravitreal applizierte VEGF-Inhibitoren (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Denn es ist bekannt, dass VEGF-Inhibitoren nach intravitrealer Applikation in den systemischen Kreislauf gelangen und dort Einfluss auf die systemischen VEGF-A-Spiegel nehmen (74, 94-96). Besonders bei Frühgeborenen, bei denen die Organe noch nicht vollständig ausgereift sind (vgl. Abschnitt 1.1.2), könnte dies zu Problemen vielfältiger Art führen (93, 97). In der BEAT-ROP Studie wurde der Einfluss der verschiedenen Interventionen auf die systemischen VEGF-A-Spiegel nicht überprüft. Ob die Absenkung der systemischen VEGF-A-Spiegel bei den Frühgeborenen, welche nach Einsatz von verschiedenen VEGF-Inhibitoren (74, 94, 98) und Laserkoagulation (99) gezeigt wurde, negative Auswirkungen auf die Entwicklung des Kindes zur Folge hat, ist derzeit nicht bekannt. In einer Veröffentlichung von Lien *et al.* (100) wurde vor kurzem beschrieben, dass es unter Kombination von Laserkoagulation und Bevacizumab im Vergleich zur alleinigen Laserkoagulationstherapie vermehrt zu geistigen und motorischen Einschränkungen im Alter von zwei Jahren gekommen war. Bei alleiniger Bevacizumab-Therapie waren hier jedoch keine schlechteren Ergebnisse erreicht worden, als in den mit Laser behandelten Patienten (100). Daten aus dem kanadischen Neonatologie Netzwerk zeigten schlechtere kognitive Leistungen bei Kindern, die mit Bevacizumab behandelt wurden, im Vergleich zu Kindern, die mit Laserkoagulation behandelt wurden (101). In beiden Fällen wurde jedoch keine Randomisierung durchgeführt und es handelt sich um retrospektive Daten. Aus diesem Grund ist es umso wichtiger, in einer randomisierten, prospektiven Studie die intravitreale VEGF-Inhibition zu untersuchen und auch bei den Nachkontrollen die geistige und motorische Entwicklung der Kinder zu berücksichtigen.

### 1.2.6 Besonderheiten von klinischen Prüfungen bei Frühgeborenen

#### 1.2.6.1 Rechtliche Aspekte

Seit 2006 gibt es eine EU Verordnung ((EG) Nr. 1901/2006) (102), in der vorgeschrieben wird, dass ein Wirkstoff nach Neuzulassung auch an Kindern getestet werden muss, wenn es Indikationen für den Wirkstoff gibt, von denen auch Kinder betroffen sein können. Diese Verordnung wurde erlassen, da viele Arzneimittel in Verkehr gebracht worden waren, ohne eine Anwendung an Kindern zu untersuchen. Deswegen liegen für viele Medikamente immer noch weder eine Zulassung noch Informationen zur geeigneten Dosierung für Kinder vor und es gibt nur wenige kindgerechte Zubereitungen. Trotz dieser Verordnung, waren im Bereich der Versorgung von Frühgeborenen im November 2017 nur ca. 15 Studien im Deutschen Register für Klinische Studien zu finden, bei denen die Rekrutierung offen war (Zugriff am 4.11.2017, [https://www.drks.de/drks\\_web/](https://www.drks.de/drks_web/); Suchbegriffe: Frühgeborene; NICU).

Dabei gibt es für Frühgeborene keine weiteren zusätzlichen Vorgaben für die Durchführung einer klinischen Studie, es gelten die Vorschriften für Minderjährige. Studien bei Minderjährigen können nach §40 (4) AMG (103) nur dann durchgeführt werden, wenn das eingesetzte Arzneimittel für Minderjährige bestimmt ist und eine klinische Prüfung an Erwachsenen keine ausreichenden Ergebnisse erbringen würde. Seit Umsetzung der EU-Richtlinie 2001/20/EG (104) in deutsches Recht muss nun nur noch ein Gruppennutzen zu erwarten sein, wenn Minderjährige in eine klinische Studie eingeschlossen werden sollen. Im Vergleich dazu musste vor der Gesetzänderung ein individueller Nutzen zumindest wahrscheinlich sein. Allgemein gelten besonders hohe Ansprüche an die wissenschaftliche Begründung der Umsetzung von klinischen Studien bei Minderjährigen. Die Aufklärung und die Einwilligung in die Teilnahme an einer klinischen Studie erfolgt bei Minderjährigen durch die gesetzlichen Vertreter, wobei die Kinder zusätzlich entsprechend ihrer Möglichkeiten aufgeklärt werden und der Teilnahme an einer Studie widersprechen können (105). Im Falle von Neu- oder Frühgeborenen ist es nur möglich, die Eltern bzw. gesetzlichen Vertreter über die Teilnahme an einer klinischen Studie aufzuklären. Insgesamt muss bei Minderjährigen besonders darauf geachtet werden, dass möglichst wenige Belastungen und Risiken mit der klinischen Prüfung einhergehen (105). So werden Blutentnahmen, wenn sie vermeidbar sind, nicht genehmigt oder sie müssen während der routinemäßigen Blutentnahmen, die auch ohne Studienteilnahme stattgefunden hätten, erfolgen (106).



Der Bericht über die Ergebnisse der klinischen Studie muss bereits nach sechs Monaten vorgelegt werden (Artikel 46 (EG) Nr. 1901/2006) (102), bei Erwachsenen dagegen beträgt die gesetzlich festgelegte Frist 12 Monate §42b AMG (103).

### 1.2.6.2 Besondere Situation der Eltern

Abgesehen von den rechtlichen Aspekten, muss bei der Durchführung einer klinischen Studie an Frühgeborenen natürlich noch die besondere Situation, in der sich die Eltern nach der Geburt ihres Kindes befinden, beachtet werden. Eine Frühgeburt ist nicht nur für das Kind mit langwierigen Folgen verbunden, sondern auch für die Eltern traumatisierend. Es wird berichtet, dass die Eltern von Frühgeborenen über mehrere Monate hinweg an einer posttraumatischen Belastungsstörung leiden (107) und die Mütter besonders emotional auf die Frühgeburt reagieren (108). Zum Teil hält die Belastungsstörung, welche mit Symptomen einer Depression und Angst einhergeht, bis zu 14 Monate nach der Geburt an (109).

In ihrer qualitativen Studie zur Untersuchung der Einstellung von Eltern gegenüber einer Teilnahme ihrer Kinder an klinischen Studien beschreiben Caldwell *et al.* (110) viele Punkte, die Eltern bei der Entscheidung für oder gegen eine Studienteilnahme ihres Kindes in Betracht ziehen. Ein potentiell Risiko ist der unbekannte Effekt, den das Medikament auf den sich noch entwickelnden Organismus haben könnte, sowie die Angst, dass das Kind durch die Studienteilnahme zusätzliche schmerzhaft oder unangenehme Untersuchungen ertragen muss. Als kritisch sehen viele Eltern auch, dass sie die Entscheidung für ihre Kinder treffen müssen und entscheiden sich dann in manchen Fällen dagegen, obwohl sie sich, wenn sie selbst betroffen wären, für die Teilnahme entschieden hätten. Als Vorteile einer klinischen Studie sind unter anderem die bessere Überwachung und Untersuchung der Kinder genannt, ebenso wie die Aussicht darauf, eine möglicherweise wirksamere Therapie als die Standardtherapie zu erhalten (110).

Trotz der kritischen Situation, in der sich die Eltern nach einer Frühgeburt befinden, zeigten Morley *et al.* in ihrer Studie, dass der Großteil der Eltern von Frühgeborenen nichts gegen eine Teilnahme ihres Kindes an klinischen Studien hätte, in die Teilnahme einwilligen würde, jedoch selbst diese Entscheidung treffen möchte und auch kein Problem damit hätte, wenn das Kind an mehreren Studien teilnehmen würde (111).

### 1.3 Grundlagen retinaler angioproliferativer Erkrankungen

Für die Zusammenfassung der Grundlagen retinaler angioproliferativer Erkrankungen wurde, soweit nicht anders angegeben, das Buch „Retinal Vascular Disease“ (112) verwendet.

In der Retinologie sind mittlerweile sehr viele verschiedene Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts bekannt. Da es den Rahmen dieser Dissertation sprengen würde, auf alle Erkrankungen, die die Retina betreffen, wie z.B. Venen- und Arterienverschlüsse, Gefäßabnormalitäten, Entzündungen und Tumore einzugehen, wird der Schwerpunkt auf angioproliferative Erkrankungen der Netzhaut gelegt. Zu dieser Art von Erkrankungen zählen neben der Frühgeborenenretinopathie unter anderem auch die neovaskuläre altersbedingte Makuladegeneration und die diabetische Retinopathie.

#### 1.3.1 Vaskuläre Strukturen im Zusammenhang mit angioproliferativen retinalen Erkrankungen

Die angioproliferativen Netzhauterkrankungen zeichnen sich durch ein überschießendes Wachstum undichter, okulärer Gefäße aus. Dies kann zum einen die chorioidalen Gefäße betreffen, wie es bei der feuchten altersbedingten Makuladegeneration der Fall ist, oder die retinalen Gefäße, wie z.B. bei der Frühgeborenenretinopathie und der proliferativen diabetischen Retinopathie. Durch diese pathologischen Gefäße kann es zu Blutungen, Austreten von Plasma und Netzhautabhebungen kommen (113). Um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen, kommen sehr häufig *in vitro* Modelle und Tiermodelle zum Einsatz. Als *in vitro* Modelle sind unter anderem der Migrationsassay, der Tube Formation Assay, die Sprossung aus einem Aortenring und der Endothelzellsphäroidassay zu nennen (114). *In vivo* existieren einige Tiermodelle für die Frühgeborenenretinopathie, unter anderem bei Katzen und Hunden, sowie bei Ratten und Mäusen, in denen durch Variation der Sauerstoff Konzentration die zwei Phasen, die bei der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie nacheinander ablaufen, bestmöglich imitiert werden (113).

Da im Rahmen dieser Dissertation das *in vitro* Sphäroid-Angiogenesemodell, sowie das Mausmodell der sauerstoffinduzierten Retinopathie (engl.: oxygen induced retinopathy, OIR) verwendet wurden, werden diese beiden Modelle im Folgenden kurz erörtert.

##### 1.3.1.1 Sphäroidmodell

In dem in dieser Dissertation verwendeten Sphäroidmodell werden Endothelzellen aus ihrer zweidimensionalen Zellkultur durch geeignete Kulturbedingungen zu dreidimensionalen Aggregaten, den so

genannten Sphäroiden umgeformt (115), welche für die weiteren Versuche in Kollagen eingebettet werden. In dieser neuen dreidimensionalen Matrix reagieren die Sphäroide hoch sensitiv auf angiogene Stimulation durch radiale Bildung von lumenhaltigen, kapillarartigen Strukturen (116-118). Diese Aussprossungen bilden die *in vivo* Situation relativ gut ab (117), somit bietet das Modell eine gute Möglichkeit, *in vitro* verschiedene Aspekte der Angiogenese isoliert zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss neuronaler Zellen auf das Sprossverhalten der Sphäroide untersucht. Ziel war es, ein *in vitro* Modell zu etablieren, in dem der Einfluss einer VEGF-Inhibition auf das neuro-vaskuläre Zusammenspiel isoliert betrachtet werden kann.

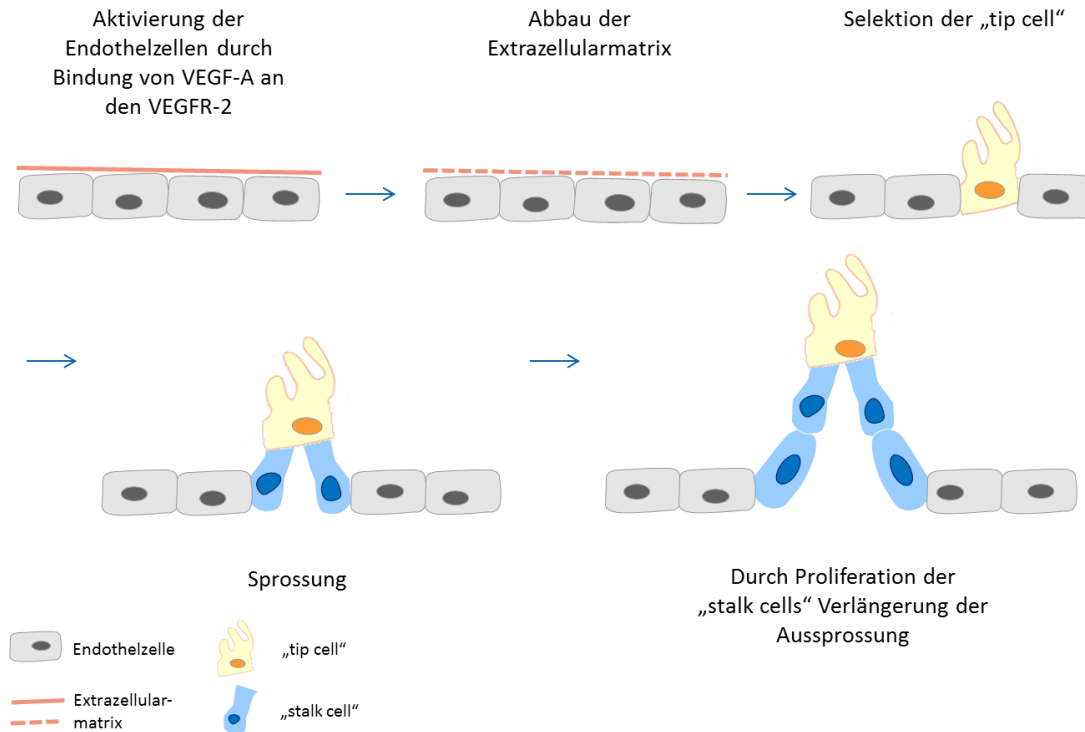
### 1.3.1.2 OIR-Modell

In dem von Smith *et al.* (51) beschriebenen Modell werden neugeborene Mäuse zusammen mit ihrer Mutter am siebten postnatalen Tag (P7) in eine 75 %ige Sauerstoffumgebung umgesetzt, in der sie bis P12 verweilen. In dieser Zeit kommt es zur Regression bereits gebildeter Gefäße und das weitere Gefäßwachstum wird unterbrochen. Ab P12 wird der gesamte Wurf wieder an Raumluft und somit einer Sauerstoff Konzentration von etwa 21 % gehalten. Die Zeit, in der sich die Mäuse in der 75 %igen Sauerstoff Atmosphäre aufhalten, entspricht der Phase I der Frühgeborenenretinopathie, in der die Frühgeborenen aufgrund der Raumluft bzw. der zusätzlichen Sauerstoffgabe im Inkubator mit mehr Sauerstoff als *in utero* konfrontiert sind. Während der Zeit, in der die Mäuse wieder in Raumluft gehalten werden, entsteht in den avaskulären Bereichen der Retina eine Hypoxie. Dadurch kommt es zur Ausschüttung von HIF-1 $\alpha$ , was wiederum zur überschießenden angiogenen Reaktion und somit zur Bildung von Neovaskularisationen und Tufts mit dem Maximum dieser Reaktion an P17 führt (113), an dem meist die Quantifizierung der Gefäßobliteration und der Proliferationen erfolgt (119). Die Ausschüttung von HIF-1 $\alpha$  triggert die VEGF-Expression, welches eine wichtige Rolle in der angiogenen Kaskade spielt, was ebenfalls im OIR-Modell nachgewiesen wurde (53). Die überschießende Reaktion entspricht der Phase II der Frühgeborenenretinopathie, in der es aufgrund des gesteigerten metabolischen Bedarfs der avaskulären Netzhautbereiche zur Proliferation von Gefäßen kommt. In der Retina der Maus bilden sich die Neovaskularisationen im weiteren Verlauf wieder zurück, sodass an P25 kaum mehr Gefäßobliteration oder Neovaskularisationen erkennbar sind (113).

### 1.3.1.3 Vaskulogenese und Angiogenese

Es gibt zwei Arten der Gefäßbildung: die Vaskulogenese, unter der man die Neubildung von Gefäßen aus Gefäßendothel-Vorläuferzellen, den so genannten Angioblasten versteht und die Angiogenese, die Entstehung von neuen Gefäßen aus bereits Vorhandenen durch Sprossen oder Spalten (25). Die Vaskulogenese ist primär in der Embryonalentwicklung und der Bildung des ersten primitiven Versorgungsnetzwerks des Embryos von Bedeutung (120).

Bei der Entstehung von neuen Gefäßen durch Sprossen oder Spalten kommt es initial zu einer Aktivierung des Endothels durch Bindung von VEGF-A an den VEGF-R2, wobei als Reaktion zuerst die umgebende Extrazellulärmatrix abgebaut wird. Zur Differenzierung zwischen der so genannten „tip cell“, die an der Spitze der Sprossung sitzt und erkennbar ist an den sich bildenden Filopodien und den umgebenden „stalk cells“ trägt unter anderem der Notch Signalweg bei. Die „tip cells“ exprimieren verschiedene Rezeptoren, wie z.B. ROBO-4 (Roundabout-4), Neuropilin und VEGFR-2, die an der Regulation des gerichteten Sprossens beteiligt sind. Die eigentliche Proliferation und Lumenbildung findet im Bereich der „stalk cells“ statt. Mehrere „tip cells“ an der Spitze von Aussprossungen, die in Kontakt miteinander kommen, können fusionieren und so ein komplexes Netzwerk formen. Durch den Blutfluss kommt es zu Umbauprozessen, wobei weniger durchblutete Bereiche wieder abgebaut und andere stark durchblutete stabilisiert werden. Zur Ausreifung der Gefäße werden murale Zellen, wie z.B. Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert und Extrazellulärmatrix aufgebaut. An diesem Vorgang sind unter anderem TGF- $\beta$ , Angiopoietin-1 und PDGFR- $\beta$  beteiligt. Eine Übersicht über diese Vorgänge ist in Abbildung 6 dargestellt. (Zusammengefasst nach Potente *et al.* (121))



**Abbildung 6:** Aktivierung von Endothelzellen und die Bildung der ersten Sprossung aus einem bestehenden Gefäß (nach Geudens I. und Gerhardt H. (122))

#### 1.3.1.4 Beteiligung von VEGF-A an retinalen proliferativen Erkrankungen – VEGF-A-Signalweg

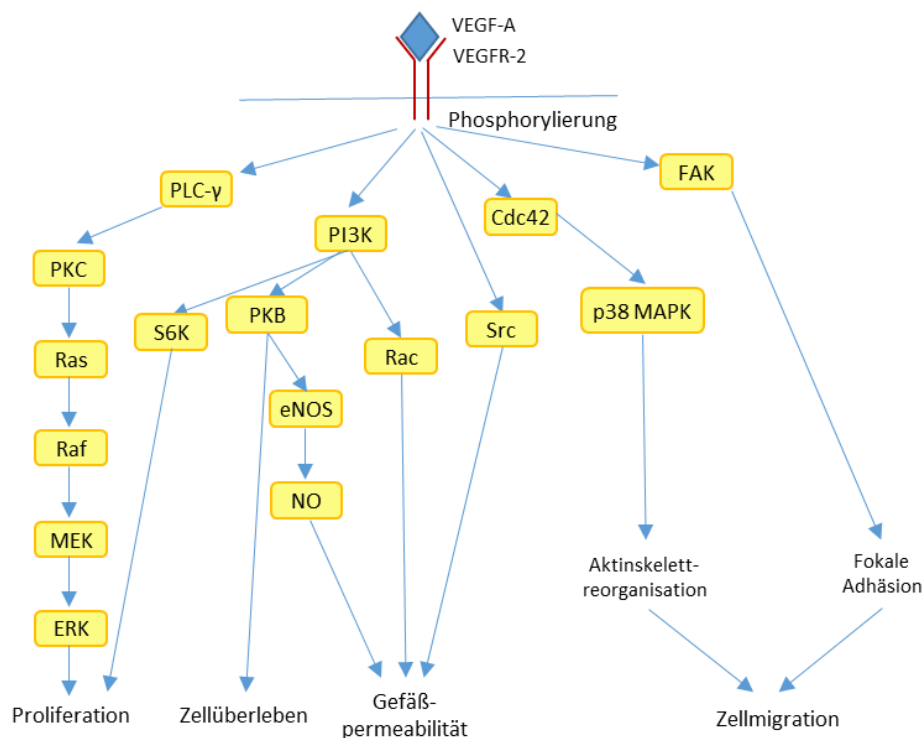
Dass VEGF-A an der Entstehung retinaler proliferativer Erkrankungen beteiligt ist, ist mittlerweile allgemein anerkannt. Es wurde gezeigt, dass intraokular gemessene VEGF-A-Spiegel bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie und Stadium 4 oder 5 der Frühgeborenenretinopathie erhöht sind (123-125). Eine intravitreale Injektion von rekombinantem VEGF<sub>165</sub> in Affen führt zur Entstehung von Neovaskularisationen und Leckagen (126) und eine reine VEGF-Inhibition kann Neovaskularisationen unterdrücken sowie zum Rückgang von Leckagen führen (127). Es sind zwar noch andere Faktoren an der Entstehung einer Neovaskularisation beteiligt (128), jedoch ist VEGF-A der wichtigste derzeit bekannte Faktor.

VEGF-A wird vermehrt unter hypoxischen Bedingungen gebildet (129). Dabei kommt es zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  (bei Normoxie wird HIF-1 $\alpha$  hydroxyliert und dadurch für den Abbau markiert), welches sich an das HRE (HIF response element) in der Promotor Region bestimmter Gene anlagert und somit zur vermehrten Expression von unter anderem VEGF-A führt (130). Die verschiedenen Effekte von VEGF-A werden hauptsächlich durch eine Bindung an den VEGFR-2 vermittelt (15). Zwar ist die Bindungsaffinität von VEGF-A an den VEGFR-1 ca. 10-fach größer als an den VEGFR-2, der VEGFR-1 wirkt jedoch

## Einleitung

hauptsächlich modulierend auf die durch den VEGFR-2 vermittelten Prozesse (12). Ein Fehlen des VEGFR-1 in der Embryonalentwicklung hat dennoch massive Folgen. Denn Endothelzellen in VEGFR-1 Knockout Mäusen proliferieren stark, bilden jedoch keine lumenhaltigen Gefäße, was zur Letalität dieser Mäuse führt (17, 131) (siehe auch Kapitel 1.1.2).

Eine Bindung von VEGF-A an den VEGFR-2, der hauptsächlich in der Embryogenese, Vaskulogenese und Angiogenese auf Endothelzellen exprimiert wird, führt zu einer Homodimerisierung des Rezeptors, in der Folge zu einer Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosin-Resten und über eine Phosphorylierung weiterer Proteine zu deren Aktivierung. Die Bindung von VEGF-A an den VEGFR-2 führt unter anderem zu einer Steigerung von Proliferation, Überleben und Migration von Endothelzellen sowie einer vermehrten Gefäß Permeabilität, in der Summe also zu Angiogenese und Gefäßentwicklung. Eine Übersicht über den VEGF-A/VEGFR-2 Signalweg ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7:** Die wichtigsten Kaskaden im VEGF-A/VEGFR-2 Signalweg (modifiziert nach Takahashi und Shibuya (19)).

Bindung von VEGF-A an den VEGFR-2 führt zu einer Steigerung von Proliferation, Zellüberleben, Gefäßpermeabilität und Zellmigration von Endothelzellen und damit insgesamt zu Angiogenese und Gefäßentwicklung. PLC-γ: Phospholipase C-γ; PKC: Proteinkinase C; Ras/ Raf/ Rac: Rho-GTPasen; MEK: MAPK/ERK Kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; S6K: S6 Kinase; PKB: Proteinkinase B; eNOS: endotheliale NO Synthase; NO: Stickstoff Monoxid; Cdc42: eine Rho-GTPase; Src: eine Tyrosinkinase; p38 MAPK: p38 mitogen aktivierte Protein Kinase; FAK: focal adhesion kinase

Die Steigerung der Proliferation resultiert hauptsächlich aus der Aktivierung des Ras/Raf/MEK/ERK Signalwegs. Dieser wird über eine Phosphorylierung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) induziert, welche ihrerseits die Proteinkinase C anregt und das Signal weiter auf die Rho-GTPase Ras überträgt. Die Aktivierung von ERK führt dann zur vermehrten Bildung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Jun und Fos oder auch Aktivatorprotein AP1. Das Zellüberleben wird hauptsächlich über die Proteinkinase B reguliert, wobei es zur Bildung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und von Apoptose Inhibitoren wie z.B. Survivin kommt. Außerdem werden Caspase-3 und -7, welche apoptotisch wirken, gehemmt. Die Phosphorylierung der Proteinkinase B führt des Weiteren auch zur Induktion der endothelialen NO-Synthase (Stickstoffmonoxid Synthase) und damit zu vermehrter NO Produktion, welches die Gefäßpermeabilität erhöht. Auch die durch PI3K aktivierte Rho-GTPase Rac führt direkt zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität. Aktivierung der Tyrosinkinase Src führt über Ausschüttung von NO oder einer Aktivierung der Rho-GTPase Rac ebenfalls zur Steigerung der Gefäßpermeabilität. Die Zellmigration wird über die p38 MAPK, welche zu einer Reorganisation des Aktinskeletts führt, gesteigert, ebenso wie durch eine Aktivierung der Kinase FAK (focal adhesion kinase), welche Einfluss auf die fokale Adhäsion der Zellen hat. (Zusammengefasst nach Koch *et al.* (18) und Takahashi und Shibuya (19))

### 1.3.2 VEGF-Inhibition als Behandlungsoption retinaler vaskulärer Erkrankungen

Noch vor wenigen Jahrzehnten waren die Behandlungsoptionen für retinale Erkrankungen äußerst begrenzt und Erkrankungen wie die feuchte altersbedingte Makuladegeneration konnten nicht, bzw. nur unzureichend behandelt werden. In den letzten Jahren hat sich dies massiv geändert: nach und nach wurden verschiedene Behandlungsmethoden in klinischen Studien untersucht, sodass mittlerweile mehrere Optionen zur Behandlung retinaler proliferativer Erkrankungen erhältlich sind. Die erste Methode, mit der die altersbedingte Makuladegeneration behandelt wurde, war die Koagulationstherapie, welche später von der photodynamischen Therapie (PDT) abgelöst wurde. Beide Optionen werden heute nur noch in Ausnahmefällen angewendet und wurden zumindest für die Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration fast vollständig durch VEGF-Inhibitoren ersetzt (132). Auch die Therapie der diabetischen Retinopathie hat sich gewandelt: angefangen mit der Koagulationstherapie über die Möglichkeit einer Vitrektomie, bis hin zur VEGF-Inhibition, wobei in der Behandlung dieser Erkrankung sowohl die Vitrektomie, als auch die Laserkoagulationstherapie neben der VEGF-Inhibition noch heute einen wichtigen und berechtigten Stellenwert haben (133).

## Einleitung

Pegaptanib wurde in den USA im Jahr 2004 als weltweit erster VEGF-Inhibitor zugelassen. Bei dem Wirkstoff handelt es sich um ein pegyliertes Aptamer, also eine einsträngige Nukleinsäure, die spezifisch die VEGF<sub>165</sub> Splicevariante bindet (134). Gegenüber Placebo oder auch PDT erwies sich die Therapie mit Pegaptanib als überlegen (135, 136). Mittlerweile ist jedoch auch Pegaptanib weitgehend von anderen VEGF-Inhibitoren ersetzt worden (132). Hierbei sind als zugelassene VEGF-Inhibitoren Ranibizumab und Aflibercept zu nennen, off-Label wird außerdem noch Bevacizumab eingesetzt. Ranibizumab ist ein humanisiertes Antikörper-Fab-Fragment, also der Teil eines Antikörpers, der das Antigen bindet, in diesem Fall mit hoher Affinität verschiedene VEGF-A Splice-Varianten (137). Es ist für die Behandlung der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration, einer Visusbeeinträchtigung infolge eines diabetischen Makulaödems, aufgrund eines retinalen Venenverschlusses oder einer chorioidalen Neovaskularisation zugelassen (Fachinformation Lucentis®, Stand November 2016 (138)). Bei Aflibercept handelt es sich um ein Fusionsprotein aus Fragmenten der extrazellulären Domänen der humanen VEGFR-1 und -2 mit dem Fc-Fragment eines humanen IgG1 Antikörpers (139). Es bindet alle VEGF-A Splice-Varianten, VEGF-B und PlGF (139) und ist mittlerweile für dieselben Indikationen wie Ranibizumab zugelassen (Fachinformation Eylea®, Stand Juli 2017 (140)). Auch Bevacizumab bindet alle VEGF-A Splice-Varianten, jedoch handelt es sich bei dem Molekül um einen vollständigen IgG-Antikörper (141). Tabelle 3 stellt die genannten Substanzen in Bezug auf das Molekulargewicht, die okulare Halbwertszeit in Kaninchen und Mensch, sowie die systemische Halbwertszeit im Menschen gegenüber (zusammengefasst nach Krohne *et al.* (142)).

**Tabelle 3:** Halbwertszeiten von VEGF-Inhibitoren nach intravitrealer Applikation (modifiziert nach Krohne *et al.* (142))

Wirkstoff	Molekülklasse	Molekulargewicht [kDa]	Okulare Halbwertszeit (Kaninchen) [Tage]	Okulare Halbwertszeit (Mensch) [Tage]	Systemische Halbwertszeit (Mensch)
Aflibercept	Fc-Fragment-Fusionsprotein	115	4,79	Keine publ. Daten	2-6 Tage
Bevacizumab	IgG-Antikörper	149	4,32 / 5,95 (je nach Quelle)	9,82 / 10 / 6,7 (je nach Quelle)	20 Tage
Pegaptanib	RNA-Aptamer	50	3,46	8	Keine publ. Daten
Ranibizumab	Fab-Fragment	48	2,9	7,19 / 9 (je nach Quelle)	2 h

Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Molekulargewichte würde man eine weit größere Differenz in der okularen Halbwertszeit erwarten (für Aflibercept gibt es derzeit noch keine publizierten Daten zur Halbwertszeit beim Menschen; im Kaninchen ist die Halbwertszeit von Aflibercept jedoch vergleichbar mit der von Bevacizumab). Die doch recht ähnlichen okularen Halbwertszeiten werden auf das



Vorhandensein des IgG-Teils bei Aflibercept und Bevacizumab zurückgeführt. Im RPE liegt ein neonataler Fc-Rezeptor (FcRn) vor, der Antikörper über den IgG-Teil bindet und diese aus dem Auge in den systemischen Kreislauf transportiert (143). Ranibizumab dagegen wird nicht gebunden und verlässt das Auge durch Diffusion. Die größeren Moleküle diffundieren zwar langsamer durch die Retina, werden dafür aber aktiv aus dem RPE transportiert. Im systemischen Kreislauf führt der Fc-Rezeptor dazu, dass die Substanzen, die einen Fc-Teil aufweisen (Bevacizumab und Aflibercept), nicht lysosomal abgebaut, sondern wieder zurück in den Blutkreislauf abgegeben werden. Daraus resultieren die deutlich höheren systemischen Halbwertszeiten von Aflibercept und Bevacizumab im Vergleich zu Ranibizumab (vergleiche Tabelle 3). (Zusammengefasst nach Krohne *et al.* (142))

Durch die deutlich längere Verweildauer der Substanzen im Blutkreislauf werden auch die systemischen VEGF-A-Spiegel durch Bevacizumab und Aflibercept länger gesenkt, als dies nach Ranibizumab-Behandlung der Fall ist, wie eine Studie von Avery *et al.* an Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration zeigt (95). In dieser Studie wurde beschrieben, dass die VEGF-A-Konzentration im Serum nach Aflibercept und Bevacizumab Behandlung deutlich absinkt, während dies für Ranibizumab in dieser Population nicht der Fall war. Auch für intravitreal mit VEGF-Inhibitoren behandelte Frühgeborene gibt es hierzu erste Fallberichte (74, 94). Bei den Frühgeborenen aus der Studie von Sato *et al.* sank nach Behandlung mit insgesamt 0,5 mg Bevacizumab die Serum-VEGF-Konzentration von  $1628 \pm 929$  pg/ml vor der Injektion auf  $269 \pm 157$  pg/ml zwei Wochen nach der Injektion (94). Nach einer Behandlung mit Ranibizumab berichten Hoerster *et al.* (74) in einem Fallbericht von einem Abfall der VEGF-Konzentration auf unter die Nachweisgrenze, wobei hier der Baselinewert mit 170 pg/ml deutlich niedriger lag und eine andere Messmethode (Luminex) zum Einsatz gekommen war als in der Studie von Sato *et al.* (ELISA) (94).

Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, ist VEGF an der Entwicklung des Gefäßsystems sowie verschiedener Organe bis zum Ende der Schwangerschaft und auch darüber hinaus beteiligt. Aufgrund der zu frühen Geburt sind viele Organe der Frühgeborenen noch nicht ausgereift, befinden sich somit noch in einer Wachstumsphase und könnten deshalb besonders sensibel auf eine systemische Absenkung des VEGF-Spiegels reagieren. Bisher sind die Langzeit Auswirkungen von intravitrealer VEGF-Inhibition bei Frühgeborenen jedoch nicht in einer randomisierten klinischen Studie untersucht worden, sodass noch nicht bekannt ist, inwiefern ein Absenken des VEGF-Spiegels über einen zum Teil relativ langen Zeitraum in dieser Entwicklungsphase Auswirkungen auf die späteren geistigen und motorischen Leistungen hat. In der im Rahmen dieser Dissertation betreuten klinischen Studie wurden aus diesem Grund an mehreren Zeitpunkten vor und nach der Injektion Blutentnahmen zur Untersuchung der systemischen

VEGF-A-Spiegel sowie Langzeit Kontrollen bis zu fünf Jahre nach Studienbeginn geplant. Das Problem, dass in der Literatur so vielfältige VEGF-Messmethoden zum Einsatz kommen und die angegebenen Messwerte kaum vergleichbar sind (siehe Messwerte von Sato *et al.* (94) und Hoerster *et al.* (74)), wurde durch das vor der Studie durchgeführte Vorprojekt zur Etablierung einer VEGF-Messmethodik gelöst. Dabei wurde der Einfluss verschiedener prä-analytischer Faktoren, wie z.B. die Zentrifugenart, das Antikoagulans, die Kanüle und das Geschlecht auf den Messwert untersucht und ein Blutabnahmeprotokoll für die CARE-ROP Studie etabliert (siehe auch Abschnitt 4.1.3).

### 1.3.3 Beteiligung neuronaler Strukturen an retinalen vaskulären Erkrankungen

Daten aus der Klinik lassen darauf schließen, dass an der Entstehung retinaler proliferativer Erkrankungen auch neuronale Strukturen beteiligt sind. So wurde beobachtet, dass bei Patienten mit einer proliferativen diabetischen Retinopathie die Proliferationen zurückgingen, wenn die Photorezeptoren aufgrund einer zusätzlichen Retinitis Pigmentosa zugrunde gingen (144). In präklinischen Untersuchungen konnte diese Beobachtung in verschiedenen Modellen bestätigt werden. Bei Mäusen, die eine Degeneration der äußeren Netzhaut zeigen, ist die durch Hypoxie induzierte Neovaskularisation geringer, als bei intakter äußerer Netzhaut (145). Neben den Photorezeptoren scheinen auch die Gliazellen und die Ganglienzellen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit physiologischem und pathologischem Gefäßwachstum im Auge zu spielen, denn Mäuse, denen retinale Ganglienzellen fehlen, bilden keinen retinalen Gefäßplexus aus (146) (Zusammengefasst nach Stahl *et al.* (113)). Auch bei der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie spielen neuronale Zellen eine wichtige Rolle, denn sie tragen durch ihren gesteigerten Metabolismus zur Hypoxie bei und damit zur überschießenden Reaktion der Gefäße (35).

#### 1.3.3.1 Neuro-vaskuläres Interface

Das neuro-vaskuläre Interface, also die Schnittstelle zwischen neuronalen Zellen und den Gefäßen spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, also der Bildung eben dieser Strukturen (147). Außerdem ist diese Interaktion z.B. in der Retina auch an der Regulation des Blutflusses beteiligt. So induziert z.B. Flimmerlicht eine vermehrte neuronale Aktivität und als Reaktion eine Vasodilatation (148). Da Inhibitoren der NO-Synthase diesen Effekt verringern, wird eine Beteiligung von NO an dieser Interaktion angenommen (149). Durch eine Vasodilatation werden die Neurone mit zusätzlichem Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und deren gesteigerter Bedarf gedeckt. Da retinale Blutgefäße auch

$\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren exprimieren (150, 151), können auch Katecholamine zur Regulation des Gefäßtonus beitragen.

Succinat, ein Intermediärprodukt des Krebs-Zyklus, welches bei Hypoxie akkumuliert, scheint über die Bindung an den GPR91 Rezeptor auf retinalen Ganglienzellen an der neuro-vaskulären Interaktion beteiligt zu sein, denn ein Fehlen dieses Rezeptors führt zu deutlich weniger ausgeprägten Proliferationen im OIR-Modell (146).

Es gibt mittlerweile auch verschiedene Ansätze, in die Interaktion zwischen Neuronen und Gefäßen einzugreifen: z.B. besteht die Möglichkeit das  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) Neurotransmittersystem durch einen GABA<sub>c</sub> Agonist zu beeinflussen, dadurch den metabolischen Bedarf der Neurone zu senken und die Reaktion der Gefäße zu verringern (152). Durch Angiotensin II Antagonisten kann das Renin-Angiotensin-System gehemmt werden, welches an der Entstehung von retinalen Neovaskularisationen beteiligt scheint (gereviewt in Fletcher *et al.* (153)). (Zusammengefasst nach Nakahara *et al.* (154))

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine primäre retinale Zellkultur als Monolayer in der Lage ist, in Endothelzellsphäroiden Sprossung zu induzieren und somit ein mögliches *in vitro* Modell für die retinale neuro-vaskuläre Interaktion darstellen könnte. Außerdem wurde untersucht, ob eine VEGF-Inhibition einen inhibierenden Effekt auf die Interaktion zwischen neuronalen Zellen und Sphäroiden in diesem *in vitro* Modell ausübt.

### 1.3.3.2 Primäre retinale Zellkultur

Es gibt verschiedene Ansätze, primäre retinale Zellen zu kultivieren. Ein möglicher Ansatz ist es, die ganze Retina oder Stücke in Kultur zu bringen. Dabei bleiben der Aufbau der Retina, sowie viele biochemische Funktionen erhalten (155). Außerdem ist es möglich durch enzymatischen Verdau, verschiedene Gewebe, unter anderem auch die Retina, zu dissoziieren und die enthaltenen Zellen als primäre Zellkultur in einem Monolayer zu kultivieren (155, 156). Ein in der Methodik begründeter Nachteil ist, dass den Zellen der Zell-Zellverband fehlt und sie dadurch zum Teil andere Marker als *in vivo* exprimieren oder ein anderes Verhalten zeigen (157, 158). Für Versuchsansätze, bei denen Zugang zu einzelnen Zellen benötigt wird oder Transfektionen erfolgen sollen, ist diese Art von Zellkultur jedoch oft am besten geeignet. Die Zellisolation verläuft in den meisten Fällen nicht zellartspezifisch, sondern es werden nahezu alle Zellen extrahiert, die sich in dem eingesetzten Gewebe befinden. Für Retinae bedeutet dies, dass eine primäre Zellkultur eine Mischkultur verschiedener Zellen, wie z.B. retinale

## Einleitung

Ganglienzellen, amakrine Zellen, Bipolarzellen und Photorezeptoren darstellt (155). Es wurde gezeigt, dass die isolierten Zellen aus humanen Retinae (159) und Retinae von Nagetieren (160-162) mehrere Tage in Kultur überleben. Durch ein Biopanning Verfahren ist es außerdem möglich, einzelne Zellen positiv oder negativ durch Verwendung von geeigneten Antikörpern zu selektieren und so nur mit den gewünschten Zellarten zu arbeiten (162).

In dem in dieser Arbeit angewendeten Modell wurde eine retinale Mischkultur eingesetzt, da dieser Ansatz möglicherweise für die Untersuchung der neuro-vaskulären Interaktion in der Retina, an der ebenfalls verschiedene Zellen beteiligt sind, relevanter ist, als eine reine Monokultur.

### 1.3.4 miRNAs in Endothelzellen und im Zusammenhang mit Angiogenese

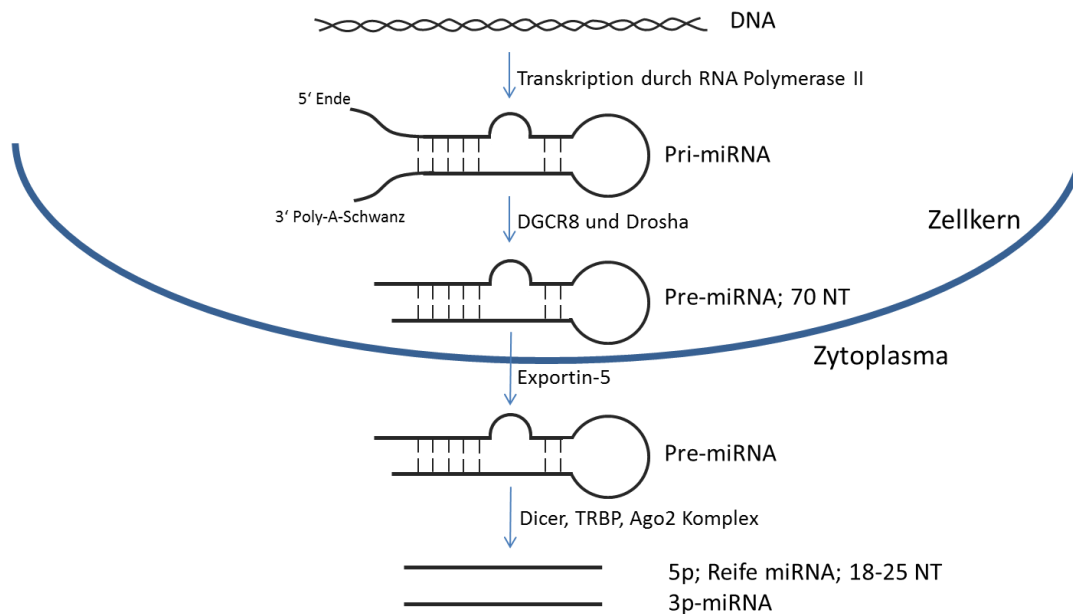
Bei microRNA (auch miRNA oder miR) handelt es sich um einzelsträngige, nicht codierende RNA mit einer Länge von 18-25 Nukleotiden (163). Der Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf das miRNA Profil von retinalen Endothelzellen war bisher noch nicht untersucht worden, weshalb dieser Aspekt der VEGF-Inhibitions-Therapie im Rahmen dieser Arbeit an HRMVECs (Human retinal microvascular endothelial cells) *in vitro*, sowie im OIR-Modell *in vivo* untersucht wurde.

Im folgenden Abschnitt wird die Biogenese und Wirkweise von miRNA beschrieben sowie die bisher bekannten Funktionen im Auge und die bekannten miRNAs aus Endothelzellen dargestellt.

#### 1.3.4.1 Biogenese und Wirkmechanismus von miRNA

Die meisten miRNA Gene werden durch die RNA Polymerase II aus der vorliegenden DNA (Bereiche zwischen Genen, Introns oder Exons) transkribiert, wobei zunächst die einige 1000 Basenpaare lange Pri-miRNAs (Primary miRNAs) entstehen (164). Es kann entweder ein eigener Promotor die Transkription der miRNA regulieren oder der Promotor des „Host-Gens“ reguliert neben der Transkription des Gens auch die Transkription der, in der gleichen Region befindlichen, miRNA (165). Die Regulation des Promotors kann z.B. durch eine Änderung des Methylierungsgrades der Promotorregion oder durch eine Histonmodifikation erfolgen (166). Außerdem können Transkriptionsfaktoren, wie c-Myc die Aktivität des Promotors beeinflussen (167). Die Pri-miRNA wird vom Enzym DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) gebunden und für die Prozessierung durch die RNase III Drosha stabilisiert (168, 169). Dabei entsteht die ca. 70 Basenpaare lange Pre-miRNA (Precursor miRNA), welche durch Exportin-5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird (170). Die Pre-miRNA wird durch die Endonuklease Dicer, in die 18-25 Basenpaare lange miRNA geschnitten (171, 172). Die Biogenese der miRNA ist in

Abbildung 8 graphisch dargestellt. (Zusammengefasst nach den Reviews von Kim (173) und Ul Hussain (166))



**Abbildung 8:** Biogenese der miRNA Aus der DNA wird durch Transkription die Pri-miRNA erzeugt. Diese wird mit Hilfe der Enzyme DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) in die ca. 70 Nukleotide (NT) lange Pre-miRNA prozessiert. Das Enzym Exportin-5 sorgt für den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Ein Komplex aus Dicer, TRBP und Ago2 erzeugt dann die zwei 18-25 NT langen reifen miRNA Stränge 5p und 3p. (Nach Agrawal S. *et al.* (174) und Gregory *et al.* (172))

Neben Dicer und TRBP befindet sich auch noch Argonaut2 in dem Komplex, der zusammen die Pre-miRNA weiter prozessiert. Dieser Komplex gleicht in seiner Funktion dem RISC Komplex (RNA induced silencing complex), wie er aus der RNA Interferenz der siRNA (small interfering RNA) bekannt ist (172). Der miRISC sorgt über zwei unterschiedliche Mechanismen für eine Herunterregulation von Genexpression. Die einzelsträngigen reifen miRNA Stränge binden über die so genannte „Seed“ Region (die Basen 2-8 am 5' Ende der miRNA) an den 3' untranslatierten Bereich der Ziel-mRNA. Bei nahezu perfekter Basenpaarung mit der mRNA kommt es durch die Bindung zum Abbau dieser. Eine imperfekte Bindung der miRNA an die mRNA resultiert in einer Inhibition der Translation der mRNA in Proteine (163). Durch verschiedene Mechanismen können diese beiden Prozesse jedoch ebenfalls beeinflusst werden. So gibt es Daten, die zeigen, dass es in bestimmten Stadien des Zellzyklus, bzw. in manchen Zellarten zu einer Hemmung der Repression der mRNA, durch Beeinflussung des miRNP, bzw. der am miRNP beteiligten Proteine und damit einer indirekten Aktivierung der Translation kommen kann (175). Man geht davon aus, dass mind. ein Drittel aller proteinkodierender Gene durch miRNAs beeinflusst werden, wobei einzelne miRNAs mehrere Proteine beeinflussen können und eine mRNA von

verschiedenen miRNAs beeinflusst werden kann (176, 177), sodass den miRNAs eine große Rolle bei der Feinregulierung der Proteinexpression zukommt. Es wird ihnen unter anderem eine Rolle bei biologischen Prozessen wie Gewebeentwicklung und -differenzierung (178), Angiogenese (179), Apoptose (180) und Regulation des Augeninnendrucks (181) zugeschrieben.

### 1.3.4.2 miRNAs in Endothelzellen

Bislang gibt es kaum Sequenzierdaten zu Endothelzellen und das miRNA Spektrum von HRMVECs, das in dieser Arbeit charakterisiert wurde, war bislang noch nicht untersucht worden. Jedoch sind Daten zum miRNA Spektrum anderer Endothelzellarten bekannt. Voellenkle *et al.* beschrieben 2012 das miRNA Spektrum von HUVECs unter Normoxie im Vergleich zu Hypoxie mittels Sequenzierung (182). Dabei stellten die Autoren fest, dass die miRNAs miR-21-5p und miR-126-3p als meist exprimierte miRNAs rund 32 % bzw. 7 % des gesamten miRNoms ausmachten. Der Großteil der gefundenen miRNAs war nur sehr gering exprimiert, allerdings gab es auch einige miRNAs, die in einer der untersuchten Gruppen noch mind. 1 % des miRNoms ausmachten. Dazu zählten unter anderem die miRNAs let-7a-5p, miR-17-5p, miR-19b-3p, miR-20a-5p, miR-29a-3p, miR-31-5p, miR-93-5p, miR-100-5p und miR-125b-5p.

McCall *et al.* haben das miRnom verschiedener Zellarten (unter anderem auch Endothel- und Epithelzellen) mit Hilfe von Microarrays untersucht und dabei festgestellt, dass die Expressionsspiegel von miRNAs bei verschiedenen Endothelzellarten übereinstimmen, was für ein zellartspezifisches Profil sprechen würde (183). In Endothelzellen zeigten sie miR-16, miR-19a-3p, miR-20a-5p, miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-30a-5p, miR-31-5p sowie miR-126-5p als sehr stark exprimiert.

### 1.3.4.3 AngiomiRs

In Dicer Deletionsversuchen wurde ein Zusammenhang zwischen miRNAs und Angiogenese festgestellt. Endothelzellen, in denen Dicer ausgeknockt wird, reagieren im Tube Formation Assay deutlich geringer auf eine Serum- oder VEGF-A-Stimulation als Zellen, die Dicer und damit auch miRNAs exprimieren (184).

Mittlerweile sind einige miRNAs bekannt, die als Hauptregulatoren der Angiogenese gelten. Zu diesen, als AngiomiRs bezeichneten miRNAs zählen unter anderem die miR-21, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-296, miR-378 und das miR-17-92 Cluster (zusammengesetzt aus den miRNAs miR-17-5p, miR-18, miR-19a, miR19b-1, miR-20a und miR-92-1). Die miR-21 wurde in verschiedenen Tumoren als stark exprimiert gefunden und wirkt über eine Enthemmung des Akt-Signalwegs (185). Das Fehlen der

Expression von miR-126 führt in Mäusen zu durchlässigen Gefäßen, Blutungen und zu embryonaler Letalität (186). Außerdem ist der Zusammenhang mit der Größe einer CNV im Mausmodell vor kurzem gezeigt worden (187). Der Effekt beruht zumindest teilweise auf einer Beeinflussung der MAPK und der PI3K nach Stimulation durch VEGF. Unter Anwesenheit von Serum wurde die miR-130a als vermehrt exprimiert gefunden, welche anti-angiogene Proteine inhibiert (188).





## 2 Zielsetzung der Arbeit

Mit Einführung des ersten VEGF-Inhibitors im Jahr 2006 wurde die Behandlung vieler vasoproliferativer Augenerkrankungen, wie z.B. der altersbedingten Makuladegeneration und der diabetischen Retinopathie revolutioniert. So ist es kaum verwunderlich, dass auch bei der Frühgeborenenretinopathie, einer ebenfalls vasoproliferativen Erkrankung, recht schnell erste Versuche mit der neuen Medikamentenklasse unternommen wurden, wobei es bisher noch keine Zulassung für einen VEGF-Inhibitor für diese Erkrankung gibt. Da der Einsatz dieser Medikamente bei der Frühgeborenenretinopathie dennoch immer mehr zugenommen hat, ist es wichtig (gerade weil es noch keine Zulassungsstudie gibt), weitere Erkenntnisse über Mechanismen, Sicherheit und Wirksamkeit der anti-VEGF Therapie bei der Frühgeborenenretinopathie zu erlangen, die in Zukunft zur Hypothesengenerierung herangezogen werden können.

Präklinisch sind einige Aspekte der VEGF-Inhibition bisher nicht gut untersucht: Im ersten präklinischen Projekt dieser Dissertation wird deshalb der Einfluss von VEGF-Inhibition auf das retinale neuro-vaskuläre Interface untersucht. Das neuro-vaskuläre Interface spielt bei der Frühgeborenenretinopathie eine zentrale Rolle, da durch den vermehrten Metabolismus retinaler Neurone eine teilweise überschießende Angiogenese induziert wird. Im zweiten präklinischen Teil werden mögliche Veränderungen des microRNA-Expressionsprofils von humanen retinalen microvaskulären Endothelzellen (HRMVECs) unter Stimulationsbedingungen und unter VEGF-Inhibition analysiert, da das miRNA Expressionsprofil retinaler Endothelzellen mit und ohne VEGF-Inhibition bisher noch nicht untersucht war und diese möglicherweise auch eine Rolle bei der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie spielen.

Im klinischen Teil der Arbeit wird der Status Quo der Therapie der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland unter besonderer Betrachtung des Einsatzes der VEGF-Inhibitoren zunächst anhand von Registerdaten analysiert. Da jedoch mit einer nicht-interventionellen Registerstudie viele Fragen nicht ausreichend beantwortet werden können, wird außerdem die Konzeption und Betreuung einer klinischen Prüfung zur Untersuchung zweier Dosierungen von Ranibizumab im Rahmen dieser Dissertation vorgestellt. Ein wichtiger zusätzlicher klinischer Aspekt dieser Arbeit war außerdem ein Projekt zur Etablierung einer verlässlichen VEGF-Messmethodik, da VEGF-Inhibitoren, auch wenn sie intravitreal ins Auge appliziert werden, in den systemischen Kreislauf gelangen und dort die VEGF-A-Spiegel beeinflussen können. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Messung von systemischen VEGF-A-Spiegeln unterscheiden sich stark, weshalb eine systematische Untersuchung der beeinflussenden Parameter als Vorstudie zur oben genannten klinischen Studie durchgeführt wurde.

## **Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es somit, zu beantworten, ob VEGF-Inhibitoren einen Einfluss auf das miRNA Profil von HRMVECs, sowie auf die neuro-vaskuläre Interaktion haben. Außerdem soll anhand von klinischen Registerdaten die Frage beantwortet werden, wie die VEGF-Inhibitionstherapie im Rahmen der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie aktuell in Deutschland eingesetzt wird. Zusätzlich wird die Konzeption der im Rahmen dieser Dissertation mitbetreuten klinischen Studie CARE-ROP vorgestellt. Dabei werden erste Daten gezeigt, um bewerten zu können, ob die beiden in der CARE-ROP eingesetzten niedrigen Dosierungen von Ranibizumab zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie sicher sind. Eine weitere Frage, die sich während der Vorbereitung der CARE-ROP Studie ergab, war welche Parameter Einfluss auf eine VEGF-Messung haben können und somit in der Studie standardisiert werden müssen, um verlässliche Messwerte zu erhalten.

### 3 Präklinische Aspekte

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Im folgenden Abschnitt sind die im präklinischen Teil dieser Arbeit verwendeten Substanzen (Tabelle 4), Verbrauchsmittel (Tabelle 5), Geräte und Programme (Tabelle 6) sowie Zellarten und in der Zellkultur verwendete Medien (Tabelle 7) zusammengestellt.

**Tabelle 4:** Liste der im präklinischen Teil verwendeten Substanzen

Substanz	Katalognummer	Firma
100 % Ethanol	32205-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Aflibercept (Eylea®)	PZN: 09299319	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, DE
Albumin Fraktion V	8076.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, DE
Bevacizumab (Avastin®)	PZN: 03159646	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, DE
Carbogen: O <sub>2</sub> / CO <sub>2</sub> (95 %/ 5 %)	UN3156	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH, Friedrichshafen, DE
Chloroform	C2432-25ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Corneregel®	PZN: 1224635	Bausch + Lomb / Dr. Mann Pharma, Berlin, DE
DAPI	D9542-10MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
DMSO	472301-500ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Drägersorb® 800 Plus	MX00001	Dräger, Lübeck, DE
EDTA	11280.02	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Forene 100 % (V/V); Isofluran	B506	AbbVie Deutschland GmbH & Co.KG, Ludwigshafen, DE
Glycerol	65516-500ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Humanes rekombinantes VEGF	293-VE-010	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Isopropanol	12002260	Allchem GmbH Chemikalienvertrieb, Breisach, DE
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	11668027	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysepuffer ML	740973.30	Macherey&Nagel, Düren, DE
miRCURY LNA™ microRNA-Mimic hsa-miR-335-5p, Premium, FAM	479997-611 hsa-miR-335-5p	Exiqon A/S, Vedbaek, DK
miRCURY LNA™ microRNA-Mimic Negative Control	479995-011 cel-miR-39-3p	Exiqon A/S, Vedbaek, DK
miRNeasy Mini Kit	217004	QIAGEN, Hilden, DE
miScript II RT Kit (50)	218161	QIAGEN, Hilden, DE

## Präklinische Aspekte

Substanz	Katalognummer	Firma
miScript SYBR® Green PCR Kit (200)	218073	QIAGEN, Hilden, DE
Mowiol® 4-88	475904	Calbiochem/Merck, Darmstadt, DE
Mydrum® Augentropfen	PZN: 4018422	Bausch + Lomb / Dr. Mann Pharma, Berlin, DE
Neosynephrin-POS® 5 %	PZN: 0828584	Ursapharm, Saarbrücken, DE
Normal Goat Serum	005-000-121	Dianova GmbH, Hamburg, DE
O <sub>2</sub> -medica®, O <sub>2</sub> verdichtet	UN1072	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH, Friedrichshafen, DE
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	31985070	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Papain Dissociation System	LK003150	Worthington, Lakewood, USA
Phalloidin TRITC 0,1 mg	P1951	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Ranibizumab (Lucentis®)	PZN: 10108939	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, DE
Trypan Blue 0,25 %	-	Acric Tec GmbH, Hennigsdorf, DE
Trypsin/EDTA 10x	L2153	Biochrom, Berlin, DE

**Tabelle 5:** Liste der im präklinischen Teil verwendeten Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Katalognummer	Firma
24-Well Platten	662160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cover Slips Ø12 mm	01-0012/1	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Cryogenic Vials	5000-0012	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmalhandschuhe Micro-Touch® Nitrile	700112	Ansell, Iselin, USA
Zentrifugationsröhrchen 15 ml 50 ml	T1943-1000EA T2318-500EA	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Filterspitzen Pipetten 10 µl 20 µl 100 µl 200 µl 1000 µl	FT10E FT20 FT100 FT200 FT1000(G)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Parafilm	EW-06720-40	VWR International LLC, Radnor, USA
Pasteurpipetten	150 mm	WU, Mainz, DE
Pipetten 2,5 µl 20 µl 200 µl 1000 µl	P15146B O32799B O36495B O42976B	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 10 µl 200 µl 1000 µl	70.1116 739290 2100610	Sarstedt, Nümbrecht, DE Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE Ratiolab, Dreieich, DE

Verbrauchsmittel	Katalognummer	Firma
Reaktionsgefäße		
0,5 ml	72.699	Sarstedt, Nürnberg, DE
1,5 ml	72.700	Sarstedt, Nürnberg, DE
2,0 ml	623 201	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Rotilabo®-Spritzenfilter PVDF steril, 0,22 µm	P666.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Stripetten		Corning Incorporated, Corning, USA
5 ml	4051	
10 ml	4101	
25 ml	4251	
50 ml	4501	
Zellkulturflaschen		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
T25	690160	
T75	658170	
Zellkulturschalen, viereckig	688102	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturwannen	89094-664	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

Tabelle 6: Liste der im präklinischen Teil verwendeten Geräte und Programme

Geräte	Spezifikation	Firma
Absaugpumpe	Ditabis Vacuum Aspiration System	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Autoklav	VX-75	Systec GmbH, Linden, DE
Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eismaschine	127861	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, DE
Excel	Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
Feinwaage	ALC-210.4	Sartorius AG, Göttingen, DE
Galaxy	-	Galaxy Server, Freiburg, DE
Geneontology	Biological processes	<a href="http://geneontology.org">http://geneontology.org</a>
Graphpad Prism	Version 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Californien, USA
Hamilton® syringe, 2,5 µl	Microliter #62	Hamilton Company, Reno, USA
Image J /Fiji Plugin Sphäroid.Count (geschrieben von Sebastian Johannes Maier)	Version 1.50g	LOCI, Madison, USA
Inversmikroskop	Eclipse TS100	Nikon Metrology Europe NV, Leuven, BEL
Kanüle (34 gauge) 10 mm für intravitreale Injektion	207434	Hamilton Company, Reno, USA
Konfokalmikroskop	Dmi8	Leica Microsystems, Wetzlar, DE

## Präklinische Aspekte

Geräte	Spezifikation	Firma
Kühl-/Gefrierschränke	-80°C  -20°C  KS36VVW40	Dometic WAECO International GmbH, Emsdetten, DE Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberrach an der Riß, DE Siemens, SEG Hausgeräte, München, DE
Laminar Air Flow (Sterilbank)	SAFE2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskopkamera	ProgRes®CF	Jenoptik AG, Jena, DE
miRbase		<a href="http://www.mirbase.org">http://www.mirbase.org</a>
miRwalk		<a href="http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2">http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2</a>
Neubauer Zählkammer	Blaubrand®- Zählkammern	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Operationsmikroskop	6635323410	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
Photometer	Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	Lb850	SI-Analytics, Weilheim, DE
qPCR-Gerät	Chromo4 PTC-200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
R	Aktuelle Version	R Foundation, Wien, AUT
Schüttler mit Inkubator	Unimax1010 DT (Schüttler) Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Ultraschallgerät	Sonoplus UW mini20	Bandelin, Berlin, DE
Vortexer	REAX Top; 541-10000-00	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Waage	CP622	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wärmebrutschrank	TNE 400 /SLE 500	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Wasserbad	1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, DE
Wasserbad	Thermomix 1419	B. Braun, Melsungen, DE
Zentrifugen	MiniStar Silverline Heraeus Multifuge® 1S-R Centrifuge 5415R	VWR International GmbH, Darmstadt, DE Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA  Eppendorf AG, Hamburg, DE

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten Zellarten und in der Zellkultur verwendeten Substanzen

Zellart	Katalognummer	Firma
Aqua ad injectabilia	2351744	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
B-27® Supplement (50X)	17504-044	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DPBS 1x	14190-094	Gibco®/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Endothelzellbasalmedium	PB-BH-100-2199	Pelobiotech, Planegg/Martinsried, DE
Endothelzellwachstumsmedium	PB-MH-100-2199	Pelobiotech, Planegg/Martinsried, DE
FBS Superior	S0615	Biochrom, Berlin, DE
HEPES Buffer Solution	P05-01100	PAN Biotech, Aidenbach, DE
HRMVEC	PB-CH-160-8511	Pelobiotech, Planegg/Martinsried, DE
HUVEC	C-12200	PromoCell, Heidelberg, DE
Laminin	L2020-1mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
L-Glutamin	K0282	Biochrom, Berlin, DE
Mikrovaskuläres Endothelzellbasalmedium	PB-BH-100-4099	Pelobiotech, Planegg/Martinsried, DE
Mikrovaskuläres Endothelzellwachstumsmedium	PB-MH-100-4099	Pelobiotech, Planegg/Martinsried, DE
Neurobasal®-A Medium	10888-022	Gibco®/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
N-2 Supplement (100X)	17502048	Gibco®/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	A2213	Biochrom, Berlin, DE
Poly-L-Lysine	P4832	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

### 3.1.2 Primer für qRT-PCR

Alle Primer wurden von QIAGEN (Hilden, DE) bezogen. Die miRNA Sequenzen sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

**Tabelle 8:** Liste der verwendeten Primer

miRNA	Katalognummer	Sequenz 5'	Verdünnung der cDNA
<b>Mensch</b>			
hsa-let-7e-5p	MS00031227	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	1:10/1:100
hsa-miR-21-5p*	MS00009079	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	1:100
hsa-mir-29a-3p*	MS00006566	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	1:100
hsa-mir-29b-3p	MS00006566	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	1:100
hsa-miR-100-5p*	MS00031234	AACCCGUAGAUCGAAUUGUG	1:100
hsa-miR-126-3p*	MS00003430	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	1:100
hsa-miR-126-5p*	MS00006636	CAUUAUUACUUUUGGUACGCG	1:100

miRNA	Katalog-nummer	Sequenz 5'	Verdünnung der cDNA
<b>Mensch</b>			
hsa-mir-139-3p	MS00008666	UGGAGACGCGGCCUGUUGGAGU	1:100
hsa-mir-139-5p	MS00003493	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU	1:100
hsa-mir-192-5p	MS00003689	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	1:100
hsa-mir-194-5p	MS00006727	UGUACAGCAACUCCAUGUGGA	1:100
hsa-mir-335-3p*	MS00009464	UUUUUCAUUUUGCUCCUGACC	1:100
hsa-mir-335-5p*	MS00003976	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	1:100
hsa-mir-1248	MS00014238	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUAAA	1:100
hsa-mir-1291	MS00014525	UGGCCUGACUGAAGACCAGCAGU	1:10
hsa-mir-4521	MS00040796	GCUAAGGAAGUCCUGUGCUCAG	1:100
<b>Maus</b>			
mmu-mir-139-3p	MS00033782	UGGAGACGCGGCCUGUUGGAG	1:100
mmu-mir-139-5p	MS00001596	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG	1:100
<b>Normalisierung im OIR-Modell</b>			
hsa-miR-16-5p*	MS00031493	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	1:100
RNU6-6P	MS00033740	Firmengeheimnis	1:100
SNORD72	MS00033719	Firmengeheimnis	1:100
SNORD95	MS00033726	Firmengeheimnis	1:100
mmu-miR-26b-5p	MS00001344	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	1:100

Bei den mit \*markierten miRNAs sind die murinen und die humanen Sequenzen identisch, weshalb die bereits vorhandenen humanen Primer auch im OIR-Modell verwendet wurden.

### 3.1.3 Puffer, Lösungen und Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 9 stellt eine Übersicht aller im präklinischen Teil dieser Arbeit verwendeten im Labor selbst hergestellten Lösungen und Puffer, sowie der in der Zellkultur verwendeten Medien mit ihren Zusätzen dar.

**Tabelle 9:** Liste der im präklinischen Teil angesetzten Puffer, Lösungen und Medien inklusive Zusätze

<b>Zellkultur</b>	
EDTA-PBS	Zu 500 ml PBS (steril) werden unter aseptischen Bedingungen 5 ml 50 nM EDTA-Lösung (sterilfiltriert) zugegeben.
Medium für neuronale Zellen; Neurobasal®-A Medium	3,3' 5-Triiodo-L-thyronin B27 Supplement BDNF (Brain derived neurotrophic factor) CNTF (Ciliary neurotrophic factor) BSA (Bovines Serum Albumin) Forskolin L-Glutamin N-2 Supplement (100X) N-Acetylcystein Penicillin/Streptomycin Sodium-Pyruvat



<b>Zellkultur</b>	
Methocel	3 g <i>Methylcellulose</i> in einer 250 ml Flasche mit Magnetrührer autoklavieren. 250 ml <i>Endothelzellbasalmedium</i> für 1 h auf 60°C erhitzen, die <i>Methylcellulose</i> darin lösen und für mind. 1-2 h auf dem Magnetrührer rühren. Lösung steril in 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführen und die nicht gelösten Cellulosebestandteile 3 h bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugieren. Der obere hochvisköse Überstand wird als Methocel Stocksolution im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.
Wachstumsmedium für Endothelzellen	Glutamin FCS (Fetales Kälberserum) R3-IGF-1 (rekombinanter Insulin-like Growth Factor-1) Heparin Antibiotika Hydrocortison bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) EGF (Endothelial Growth Factor) VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
Wachstumsmedium für microvaskuläre Endothelzellen	Glutamin FCS EGF bFGF Hydrocortison Antibiotika R3-IGF-1 VEGF
<b>Färbung transfizierte HRMVECs auf Cover Slips</b>	
4 % PFA	40 g <i>Paraformaldehyd</i> in 500 ml destilliertem $H_2O$ und 10 ml <i>NaOH</i> (1 M) bei 60 - 65°C unter Rühren lösen. 100 ml 10x <i>PBS</i> hinzufügen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Mit 1 M <i>HCl</i> den pH auf 7,4 einstellen und mit destilliertem $H_2O$ ad 1000 ml auffüllen. Die Lösung filtrieren (0,45 µm) und in Aliquots einfrieren.
DAPI-Mowiol	2,4 g <i>Mowiol</i> und 6 g <i>Glycerol</i> in 6 ml destilliertem $H_2O$ über Nacht unter Rühren lösen. 12 ml 0,2 M <i>TRIS</i> zugeben und bei 50°C unter gelegentlichem Schwenken lösen. Bei 5000 g 15 min zentrifugieren und den hochviskösen Überstand mit <i>DAPI</i> versetzen (Endkonzentration: 5 µg/ml).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Isolation und Zellkultivierung von (primären) Zellen**

#### **3.2.1.1 Kultivierung humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HRMVEC) und humaner umbilikalvenöser Endothelzellen (HUVEC)**

Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (engl. human retinal microvascular endothelial cells, HRMVECs) wurden von der Firma Pelobiotec bezogen und in speziellem Wachstumsmedium für mikrovaskuläre Endothelzellen kultiviert. Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl. human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) wurden von der Firma Promocell erworben und in Endothelzellwachstumsmedium (engl. Endothelial Cell Growth Medium, ECGM) kultiviert. Der Wechsel des kompletten Mediums erfolgte bei beiden Zellarten jeden zweiten Tag. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % (optische Kontrolle mittels Inversmikroskop) wurden die Endothelzellen nach folgendem Vorgehen passagiert: Nach Absaugen des Zellmediums wurden in einem Waschschrift mit 10 ml PBS (engl. Phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung) die abgestorbenen Zellen und Mediumreste aus der Kultur entfernt. Nach drei bis vier Minuten Inkubation in 3 ml 1x Trypsin/EDTA (bei T75 Zellkulturflaschen; 2 ml bei T25 Zellkulturflaschen) (unter Sichtkontrolle der Zellablösung mithilfe des Mikroskops) wurde die Trypsinierung durch Zugabe desselben Volumens an fetalem Kälberserum (engl. fetal calf serum, FCS) gestoppt. Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt (3 Minuten, 1200 rpm, Raumtemperatur (RT)), der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen im benötigten Verhältnis (max. 1:3) gesplittet. Die Passage (P) ändert sich bei diesem Vorgang um „1“, somit wird z.B. aus P2 durch einen Splitvorgang eine Kultur in P3. Sobald die Zellen erneut konfluent genug waren, erfolgten jeweils weitere Splitvorgänge, um eine ausreichende Zellzahl für die Versuche zu erhalten. Für die miRNA Versuche wurden nur HRMVECs bis Passage 11, für die HUVEC-Sphäroide nur Zellen bis Passage 7 verwendet.

#### **3.2.1.2 Zellisolation und Kultivierung primärer neuronaler Zellen aus murinen Retinae**

Für die Extraktion primärer neuronaler Zellen aus murinen Retinae wurden männliche und weibliche C57BL/6 Ex-Tiere verwendet. Die Zellisolation erfolgte zu Beginn nach der Isolationsmethode neuronaler Zellen von Huettnner und Baughman (189), unter Verwendung des Worthington Papain Dissociation Systems. Das Vorgehen analog dieses Protokolls resultierte in nur geringen Mengen an isolierten

primären neuronalen Zellen, weshalb die Methode in Teilen an das Protokoll von Barres *et al.* (162), ohne den Schritt des Biopannings, angepasst wurde:

Am Tag vor der Zellisolation wurden die 24-Well Platten mit 300 µl Poly-L-Lysin (20 µg/ml) beschichtet und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Poly-L-Lysin und Spülen mit DPBS, wurden die Schalen weiter mit Laminin (10 µg/ml) beschichtet, welches mind. 2 h bei Raumtemperatur einwirkte. Vor Zugabe der Zellsuspension wurde die Lamininlösung nochmals abgesaugt und überschüssiges Laminin mit DPBS abgewaschen. Dieses Vorgehen entspricht Vecino *et al.* (156), um eine optimale Bodenbeschichtung zum Anwachsen neuronaler Zellen zu gewährleisten.

Alle Schritte, abgesehen von der Entnahme der Retinae, erfolgten unter der Laminar Airflow (LAF) Bank, um eine Verkeimung der Zellkultur zu vermeiden. Während der Entnahme der Retinae, welche durch Marc Leinweber durchgeführt wurde, wurde Papain in 5 ml Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (im Papain Dissociation Kit enthalten) 10 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C gelöst. Bei einem pH-Wert der Lösung  $\geq 7,4$  (erkennbar durch eine rote bzw. violette Färbung der Lösung), wurde die Lösung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) bis zum Farbumschlag nach orange equilibriert, um während des Dissoziationsvorgangs genügend Sauerstoff und einen physiologischen pH-Wert zu bieten. Die DNase (ebenfalls im Kit enthalten) wurde in 500 µl EBSS gelöst (2000 Units DNase/ml) und 250 µl davon in die Papainlösung überführt. Insgesamt sind zwischen zwei und sechs Retinae gleichzeitig für die Versuche verwendet worden. In der Zeit zwischen Entnahme und weiterer Verwendung verblieben die Retinae in einem mit sterilem DPBS gefüllten Reaktionsgefäß, um eine Austrocknung der Retinae zu vermeiden und Reste des RPEs, die beim Präparationsvorgang zum Teil an der Retina haften blieben, abzuwaschen. Zum Überführen der Retinae in die Papainlösung wurde das DPBS möglichst vollständig abpipettiert und durch ca. 1 ml Papainlösung ersetzt. Die Retinae wurden durch Gießen ohne mechanische Belastung zurück in die Papainlösung überführt und für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die entstandene Suspension wurde zentrifugiert (1 Minute bei 500 rpm) und der Überstand möglichst vollständig abpipettiert. Die Trituration des Gewebes erfolgte mit einer Ovomuroid Inhibitor/DNase Lösung: Mischung des Rests der DNase Lösung mit der benötigten Menge an Ovomuroid Inhibitor Lösung sodass eine Konzentration von 80 Units DNase pro 1 ml Lösung entstand. 1 ml der Ovomuroid Inhibitor/DNase-Lösung wurde zu den Retinae gegeben, alle Retinae mit einer 1 ml Pipettenspitze langsam aufgesaugt und wieder ausgeblasen. Nach einer Wiederholung wurde die Suspension für 1 Minute bei 500 rpm zentrifugiert, der Überstand, welcher die bereits dissoziierten neuronalen Zellen enthielt, abgenommen und in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen aufbewahrt. Dieses Vorgehen wurde

so lange wiederholt, bis die gesamte Ovomucoid Inhibitor/DNase Lösung verbraucht war, wobei eine Steigerung der Triturationsintensität und -häufigkeit im Verlauf erfolgte. Zum Schluss wurde die gewonnene Zellsuspension 11 Minuten lang bei 200 g zentrifugiert und das Zellpellet im Medium (bestehend aus Neurobasal® Medium, Penicillin/Streptomycin, Sodium-Pyruvat, N-2 Supplement, 3,3',5-Triiodo-L-thyronin, L-Glutamin, N-Acetylcystein, B27 Supplement, Bovines Serum Albumin (BSA), BDNF (Brain derived neurotrophic factor), CNTF (Ciliary neurotrophic factor) und Forskolin (nach Shi *et al.* (190)) resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in 500 µl Medium in 24-Well Platten ausgesät. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage, wobei immer 300 µl Medium abgenommen und durch 300 µl frisches Medium ersetzt wurden, sodass stets eine gewisse Flüssigkeitssäule über den Zellen bestehen blieb. Vor Beginn der weiteren Versuche wurden die neuronalen Zellen 10 Tage lang in Kultur gehalten.

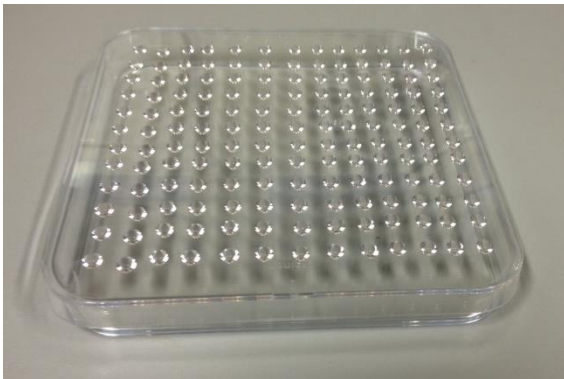
### 3.2.2 Untersuchung der Wirkung von VEGF-Inhibitoren auf das neuro-vaskuläre Interface

In einem Teilprojekt dieser Arbeit wurde der Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf das neuro-vaskuläre Interface, also die Interaktion zwischen neuronalen Zellen und Gefäßen untersucht. Zum Zeitpunkt der Geburt von Frühgeborenen ist der retinale Gefäßplexus noch nicht komplett ausgebildet und auch die Entwicklung der neuronalen Schichten der Retina noch nicht abgeschlossen. Bei Entstehen der Frühgeborenenretinopathie und zum Zeitpunkt der damit einhergehenden Therapie sind sowohl die Neuronen, als auch die Gefäße noch nicht ausgereift und ein negativer Effekt von VEGF-Inhibitoren auf die Interaktion dieser Strukturen wäre vorstellbar. Um diesen Einfluss isoliert von anderen Einflussfaktoren betrachten zu können, wurde ein Modell für das neuro-vaskuläre Interface etabliert. Dabei wurde der neuronale Part durch die primäre retinale Zellkultur repräsentiert (siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.1.2), der vaskuläre Teil durch Endothelzellsphäroide dargestellt. In diesem Modell wurde dann der Einfluss von Eylea®, welches als einziger VEGF-Inhibitor mit hoher Affinität an Maus-VEGF bindet (191, 192), auf die Interaktion überprüft.

#### 3.2.2.1 Herstellung von Sphäroiden im hängenden Tropfen

Für die Herstellung der Sphäroide wurden HUVECs bis maximal Passage 7 verwendet. Die benötigte Zellzahl berechnete sich folgendermaßen: pro Well einer 24-Well Platte (meistens 10 Wells) sollten 50 Sphäroide ausgesät werden, wobei ein Sphäroid aus 500 Zellen bestand. Bei 10 Wells ergaben sich

daraus 250.000 Zellen, die für diesen Versuch benötigt wurden. Auf die ca. 80-90 % konfluenten Zellen wurden 3 ml 1x Trypsin/EDTA gegeben, für 2-3 Minuten im Brutschrank (37°C) inkubiert und zum Stoppen der Reaktion 3 ml FCS hinzugefügt. Dann wurde die Suspension zentrifugiert (3 min, 1200 rpm, RT), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 500 µl ECGM resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer, wurde das benötigte Aliquot an Zellen zu 10 ml ECGM in einem 50er Zentrifugationsröhrchen vorgelegt, zugegeben. Aufgefüllt mit 2,5 ml Methocel auf 12,5 ml wurde die Mischung leicht geschwenkt und in eine längliche Wanne gegeben.



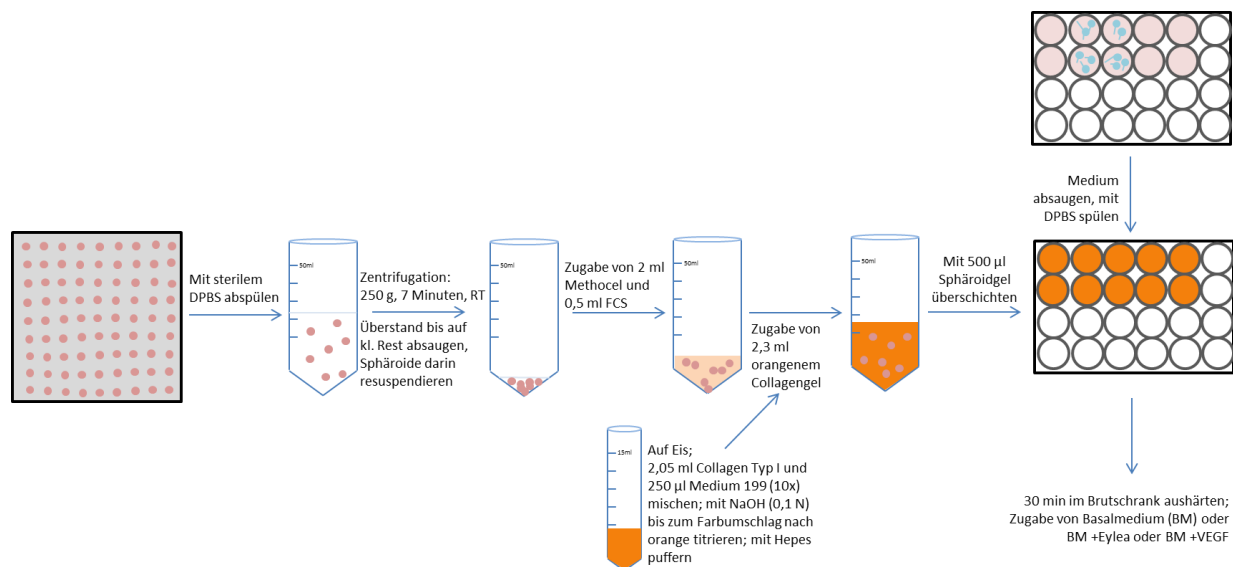
**Abbildung 9:** Kultivierung der Endothelzellsphäroide im hängenden Tropfen

Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden 25 µl Tropfen auf die Innenseite des Deckels einer quadratischen Zellkulturschale pipettiert. Der Deckel wurde umgedreht und die Sphäroide im „hängenden Tropfen“ für circa 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert (siehe Abbildung 9).

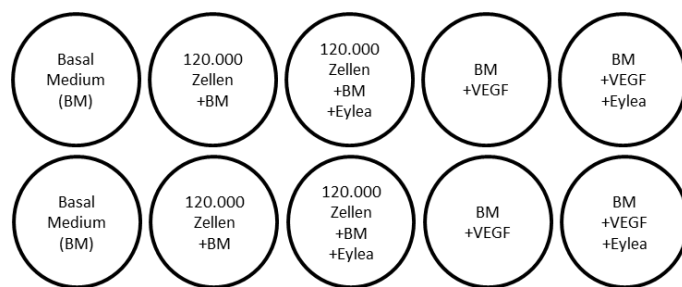
### 3.2.2.2 Sproutingassay

Endothelzellsphäroide reagieren hoch sensibel auf angiogene Stimulation durch die Ausbildung von gefäßähnlichen radialen Aussprossungen (116-118). Mit dem Sproutingassay konnte überprüft werden, ob das Vorhandensein neuronaler Zellen unterhalb des Sphäroidgels Einfluss auf das Sprossverhalten der Sphäroide hat und ob dieser Einfluss durch den VEGF-Inhibitor Eylea® gehemmt werden kann. Eine Übersicht über den Aufbau des Sproutingassays ist in Abbildung 10 dargestellt. Da sich die Gele in ihren Eigenschaften von Versuch zu Versuch unterscheiden, ist es wichtig, in jedem Versuch eine Basal-Gruppe (nur Basalmedium ohne Anwesenheit neuronaler Zellen) und eine VEGF-Gruppe mitzuführen, in der das Basalmedium mit VEGF versetzt wird, um eine maximale Stimulation zu erzeugen und zu sehen, ob die Sphäroide im Gel sprossen (falls die Sphäroide nicht sprossen, sind die Geleigenschaften ungeeignet und der Versuch kann nicht ausgewertet werden). Die neuronalen Zellen sind vor Überschichtung mit dem Gel zehn Tage kultiviert worden.

a)



b)



**Abbildung 10:** Aufbau des HUVEC Sphäroidassays; a) Zur Herstellung der Sphäroidgele wurden die Sphäroide zuerst mit DPBS abgewaschen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde Großteils abgesaugt, die Sphäroide im Rest DPBS resuspendiert und Methocel und FCS zugegeben. Währenddessen wurde das Collagengel vorbereitet und zu den Sphäroiden gegeben. Von den neuronalen Zellen wurde das Medium abgesaugt und es folgte ein Waschschritt mit DPBS. Alle Wells, auch wenn keine Zellen ausgesät waren, wurden gleichermaßen behandelt. Das Sphäroidgel wurde auf die Wells verteilt (500 µl/Well). b) Übersicht über die Wellbelegung bei der Überprüfung des Effekts von Eylea® auf das induzierte Sprossverhalten.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Sphäroide mit DPBS vom Deckel abgespült und in einem 50er Zentrifugationsröhrchen gesammelt, dann bei 250 g für 7 Minuten zentrifugiert, der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und die Sphäroide darin resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2,5 ml Methocel und 0,5 ml FCS gegeben. Während die Sphäroide abzentrifugiert wurden, konnte bereits das Gel durch Mischung von 2,05 ml Collagen Typ I mit 250 µl Medium 199 (10x) in einem 15er Zentrifugationsröhrchen (auf Eis) vorbereitet werden. Nach Titration dieser Mischung mit ca. 20 µl eiskalter Natronlauge (0,1 N) bis zum Farbumschlag nach orange wurden 50 µl HEPES (resultierende Konzentration ca. 20 mM) zum Puffern zugegeben. 2,3 ml des orangenen Kollagens wurden zur Sphäroidmischung (mit Methocel und FCS) gegeben und mehrmals resuspendiert, um eine gute Verteilung der Sphäroide im Gel zu gewährleisten. 5 ml des Gels sollten dann blasenfrei aufgezogen

und je 500 µl auf 10 Wells der im Brutschrank angewärmten 24-Well Platte verteilt werden. Vor der Schichtung des Sphäroidgels über die neuronalen Zellen, wurde das Neurobasal® Medium vollständig abgesaugt und die Wells einmal mit DPBS gespült. Die Gele härteten 30 Minuten im Brutschrank aus. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 100 µl EBM auf die Gele, welches zum Teil versetzt war mit VEGF (25 ng/ml) zur Stimulation, bzw. dem VEGF-Inhibitor Eylea® (Konzentration, die beim Erwachsenen im Glaskörper nach einer intravitrealen Injektion vorherrscht) zur Überprüfung des Effekts der neuronalen Zellen auf die Sphäroide. Nach Inkubation für mindestens 12 h im Brutschrank wurden die Sphäroide in 10-facher Vergrößerung am Inversmikroskop (Eclipse TS100, Nikon Metrology Europe NV) fotografiert (ProgRes®CF, Jenoptik AG), wobei Sphäroide, welche in unmittelbarer Nähe nebeneinander oder am Rand des Wells lagen, von der Auswertung ausgeschlossen wurden.

### **3.2.3 Bestimmung des miRNA Profils von retinalen Endothelzellen unter Hungerbedingung, sowie angiogener Stimulation bzw. Hemmung dieser Stimulation durch VEGF-Inhibitoren**

Für die Bestimmung des miRNA Profils von retinalen Endothelzellen wurden HRMVECs verwendet. Dabei handelt es sich um Zellen, welche an der Ausbildung der retinalen Gefäße und damit unter anderem an der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie beteiligt sind. Ein bisher nicht untersuchter Aspekt ist das miRNA Expressionsprofil dieser Zellen und auch die Tatsache, ob sich dieses Profil durch angiogene Stimulationsbedingungen bzw. durch partielle Inhibition dieser Stimulation durch VEGF-Inhibitoren verändert, wobei miRNAs eine wichtige Rolle bei der Feinregulation verschiedener zellulärer Prozesse spielen.

Im Folgenden sind der Versuchsaufbau sowie die weiteren Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, dargestellt. Die Sequenzierung des Expressionsprofils kleiner RNA-Sequenzen wurde von der Firma GenXPro aus Frankfurt übernommen.

#### **3.2.3.1 Versuchsaufbau**

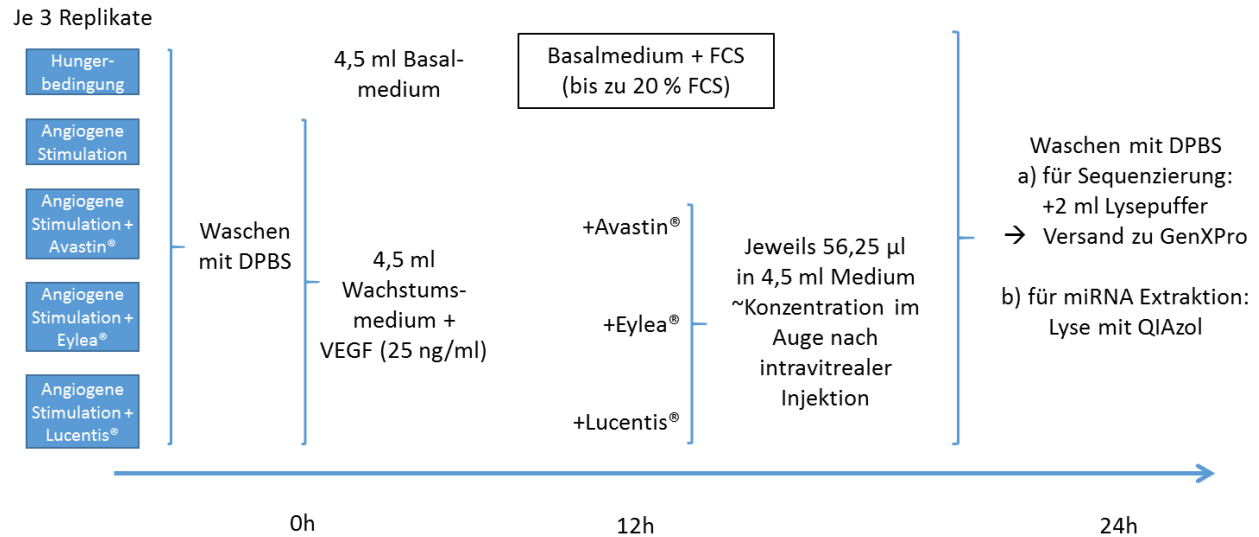
Zur Bestimmung des miRNA Profils von HRMVECs unter Hungerbedingung, sowie angiogener Stimulation, bzw. Hemmung dieser kamen fünf Gruppen (Hungerbedingung, angiogene Stimulation (AS), sowie 12 h angiogene Stimulation und anschließende 12 h Inhibition durch Avastin® (AS + Avastin®), Eylea® (AS + Eylea®) sowie Lucentis® (AS + Lucentis®)) à drei Replikate, also insgesamt 15 T25 Zellkulturflaschen zur Verwendung.

## Präklinische Aspekte

Zuerst wurde aus allen T25 Zellkulturflaschen das Medium abgesaugt und in einem Waschschrift tote Zellen und Reste von Wachstumsmedium mit DPBS gewegewaschen. In den drei Zellkulturflaschen, in denen Hungerbedingung vorherrschte, wurde das Wachstumsmedium initial durch Basalmedium mit Zusatz von 2 % FCS ersetzt. Bei Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop sah man, dass die Zellen unter dieser extremen Hungerbedingung retrahierten. Ein Absterben der Zellen sollte jedoch vermieden werden, weshalb in dieser Gruppe ein regelmäßiger Wechsel des Mediums durchgeführt und der FCS Anteil auf 10 %, über Nacht sogar auf 20 % erhöht werden musste. In der Summe herrschten somit im Vergleich zu den anderen Gruppen, bei denen zusätzlich zu den dort eingesetzten 5 % FCS verschiedene Wachstumsfaktoren im Medium vorlagen, Bedingungen einer reduzierten Stimulation vor, die Zellen konnten aber die Versuchszeit noch überleben.

In 12 T25 Zellkulturflaschen wurden nach dem Waschschrift je 4,5 ml Wachstumsmedium (enthält Glutamin, 5 % FCS, 0,5 ng/ml VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), R3-IGF-1 (recombinant Insulin-like Growth Factor-1), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), Hydrocortison, Antibiotika und EGF (Epidermal Growth Factor)), dem zusätzlich humanes rekombinantes VEGF (25 ng/ml) zugefügt worden war, gegeben – es herrschten also durch das VEGF noch deutlich verstärkte angiogene Bedingungen vor, wie sie z.B. auch in der Phase II der Frühgeborenenretinopathie herrschen. Nach 12 h wurde in je drei T25 Flaschen 56,25 µl Avastin®, Eylea® oder Lucentis® zugegeben. Die Konzentration entspricht derjenigen, welche im Auge nach der Injektion eines VEGF-Inhibitors bei Erwachsenen vorliegt. Die Menge ist stöchiometrisch gesehen ausreichend, um die im Wachstumsmedium vorliegende VEGF-Menge zu binden. Dabei wird davon ausgegangen, dass zwei Moleküle Ranibizumab ein VEGF-Dimer binden (2:1) (193), ein Molekül Aflibercept ein VEGF-Dimer bindet (1:1) (194) und ein Molekül Bevacizumab zwei VEGF-Dimere bindet (1:2), wobei man von der Bildung von Multimeren ausgeht (195). Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der Ursprungslösungen sowie der molaren Massen resultiert dieses Vorgehen, wenn man von einer vollständigen Bindung von VEGF ausgeht, dann zwar in einer unterschiedlichen molekularen Restmenge an VEGF-Inhibitor, dies entspricht jedoch der *in vivo* Situation. Die VEGF-Inhibitoren wirkten 12 h im Brutschrank bei 37°C auf die Zellen ein. Eine Übersicht der Hunger-, Stimulations- und Inhibitionsbedingungen ist in Abbildung 11 dargestellt.





**Abbildung 11:** Versuchsaufbau zur Bestimmung des miRNA Profils von HRMVECs unter Hungerbedingung, sowie angiogener Stimulation und Hemmung dieser; der Versuchsaufbau wurde bei der Sequenzierung bzw. Überprüfung der Ergebnisse mittels qPCR angewendet.

Zum Zeitpunkt der Sequenzierung waren die HRMVECs in P5. Weitere Aliquots der Zellen verblieben bis zur späteren Überprüfung der Ergebnisse mittels qPCR (die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt in P9 und P10) in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurden die Zellen zuerst trypsinisiert, das Zellaliquot in 900 µl FCS suspendiert und mit 100 µl DMSO versetzt eingefroren.

Nach 24 h Hungerbedingung, 24 h angiogener Stimulation durch das Wachstumsmedium und zusätzlichem VEGF für die Gruppe der angiogenen Stimulation, 12 h angiogener Stimulation und weiteren 12 h Inhibition durch Avastin®, Eylea® oder Lucentis® wurde das Medium abgesaugt und die Reste des Mediums, sowie tote Zellen mit PBS gewaschen. Nach möglichst vollständigem Absaugen des DPBS erfolgte die Lyse der Zellen mit 2 ml Lysepuffer ML (Sequenzierung) bzw. in 700 µl QIAzol Lyse Reagenz (miRNA Extraktion). Bis zum Versand an die Firma GenXPro (GenXPro, Frankfurt, Deutschland), welche die Sequenzierung durchführte, wurden die lysierten Zellen in 15 ml Zentrifugationsröhrchen bei -80°C gelagert. Die miRNA Extraktion erfolgte direkt im Anschluss an die Zelllyse.

Grundlage der Extraktion und Sequenzierung der miRNA durch GenXPro war das Extraktionsprotokoll von Müller *et al.* (196).

### 3.2.3.2 Auswertung der miRNA Sequenzierdaten

Die Rohdaten der Sequenzierung wurden als „Fastq“ Dateien übermittelt. Es handelte sich um eine Single-end Sequenzierung. Nach dem Laden der Rohdaten in die Online-Applikation Galaxy (197) und dem Umschreiben in „Fastqsanger“ Dateien, konnte mit verschiedenen Tools die Auswertung der Next Generation Sequencing (NGS) Daten durchgeführt werden. Der erste Schritt der Auswertung bestand in der Anwendung des „Bowtie2“ Tools (Galaxy Version 0.6) (198, 199), mit welchem gegen das Humane Genom GRCh38/hg38 annotiert wurde. Als nächstes ist aus der Online-Datenbank „miRBase v21“ (<http://www.mirbase.org/>) die aktuelle Datei der bekannten reifen miRNA Sequenzen des humanen Genoms als „hsa.gff3-File“ (gff-Version 3) in Galaxy importiert worden. Das Tool „htseq-count“ (Galaxy Version 0.6.1galaxy1) (200) zählte die annotierten Reads aus den „Bowtie2“ Dateien, welche mit den reifen miRNA Sequenzen aus dem „GFF-File“ übereinstimmten. Der anschließende Vergleich der Gruppen und die Prüfung, welche miRNA Sequenzen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen differentiell exprimiert waren mittels „DESeq2“ (Galaxy Version 2.1.8.0) (201), enthielt folgende Gruppenvergleiche: Angiogene Stimulation (AS) + Avastin® vs. reine AS, AS + Eylea® vs. AS, AS + Lucentis® vs. AS, reine AS vs. Hungerbedingung, AS + Avastin® vs. Hungerbedingung, AS + Eylea® vs. Hungerbedingung, AS + Lucentis® vs. Hungerbedingung, sowie die Gruppen AS + Avastin®, AS + Eylea® und AS + Lucentis® untereinander. Das „Filter“ Tool (Galaxy Version 1.1.0), welches nach jeder Spalte einer „DESeq2 Datei“ filtern kann, lieferte die Sequenzen, welche statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$  bei Benjamini-Hochberg Anpassung für multiples Testen) differentiell zwischen den einzelnen Gruppen exprimiert waren. Zuletzt folgten noch zwei weitere Filterschritte: In einem wurde nach den miRNA Sequenzen gefiltert, welche mindestens zweifach erhöht, bzw. erniedrigt waren. Im anderen Filterschritt wurden die miRNAs, die mindestens 1 % des miRNoms ausmachten und gleichzeitig um mind. 15 % zwischen den Gruppen verändert waren, selektiert. Eine Übersicht über den angewendeten Workflow zur Auswertung der NGS-Daten ist in Abbildung 12 dargestellt.

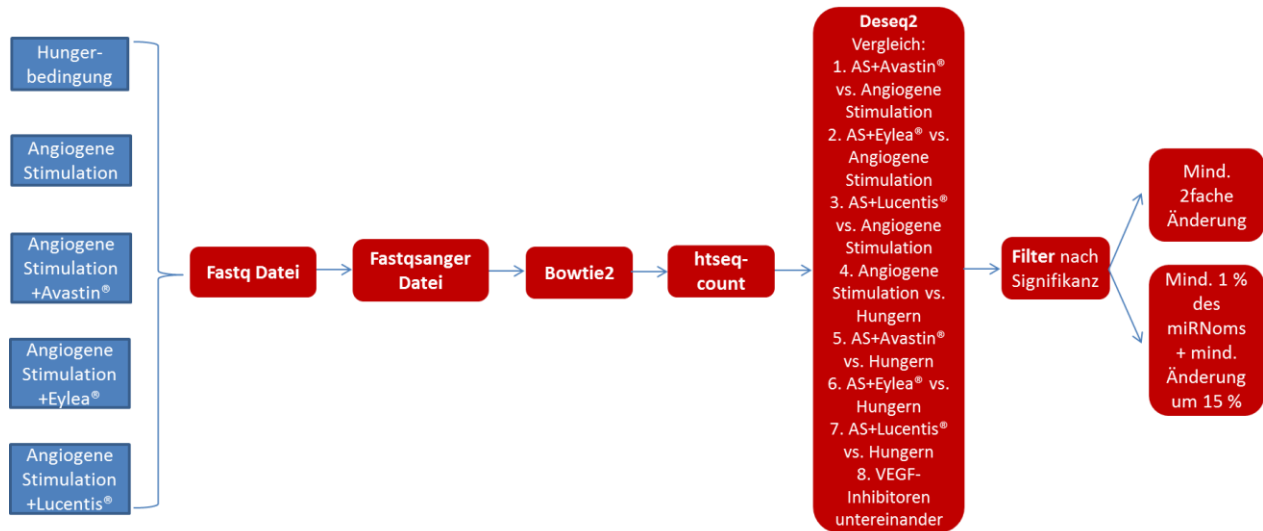


Abbildung 12: Angewendeter Workflow zur Auswertung der NGS-Daten

### 3.2.3.3 miRNA Extraktion für nachfolgende qPCR

Um die Ergebnisse des Next Generation Sequencings (NGS) zu überprüfen, wurde die Stimulation der HRMVECs (siehe Punkt 3.2.3.1) wiederholt und die miRNA Expression derjenigen miRNAs, welche bei der Auswertung der NGS-Daten signifikant ( $p \leq 0,05$ ) und relevant (mind. 2-fach) verändert waren, mittels qPCR überprüft.

Die miRNAs wurden nach Beendigung der Stimulation der Zellen mit dem QIAGEN miRNeasy Mini Kit nach Anweisung des Herstellers extrahiert: Zuerst wurden die Zellen lysiert (Zugabe von 700 µl QIAzol Lyse Reagenz, bestehend aus Phenol und Guanidin Thiocyanat zu jeder T25 Zellkulturflasche), in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 min gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Inhaltsstoffe des Lysepuffers wurden die RNasen inhibiert. Zur Abtrennung der RNA von den organischen Zellbestandteilen wurden 140 µl Chloroform zugegeben, das Reaktionsgefäß für 15 sec stark geschüttelt, um eine gute Durchmischung der gesamten Probe zu gewährleisten und weitere 2-3 min inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 12.000 g, 4°C) trennte die Phasen auf in die obere wässrige, die weiße Interphase und die untere rote organische Phase. Die obere wässrige Phase, welche die RNA enthielt, ist in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der Rest der Probe verworfen worden. Zugabe des 1,5-fachen Volumens an 100 % Ethanol schaffte geeignete Bindeeigenschaften für die miRNA in der RNeasy® Mini Säule. Durch die nachfolgenden Zentrifugationsschritte (jeweils 700 µl der Mischung pro Schritt; Zentrifugation bei mindestens 8000 g, 15 sec, RT; Wiederholung bis die komplette Probe aufgebraucht war) wurde die RNA in der RNeasy® Mini Säule gebunden und das Zentrifugat verworfen.

## Präklinische Aspekte

Zum Reinigen und Abtrennen von z.B. Phenolresten, welche weitere Reaktionen, wie z.B. die reverse Transkription stören könnten, wurden nun noch 700 µl RWT Puffer (Bestandteil des Kits, Zusammensetzung wird von der Firma nicht bekannt gegeben, enthalten sind Guanidinsalze und Ethanol) und dann zweimal je 500 µl RPE Puffer (im Kit enthalten, Zusammensetzung wird von der Firma nicht bekannt gegeben) auf die Säule gegeben und zentrifugiert (bei den ersten beiden Schritten 15 sec bei mind. 8000 g, zuletzt für zwei Minuten bei mind. 8000 g). Nachdem die RNeasy® Mini Säule in ein neues Gefäß überführt wurde, folgte nochmals ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 14000 g, sodass die Säule vollständig trocken war und keine Reste vom RPE Puffer, die weitere Versuche stören könnten, in der Säule verblieben. Zuletzt wurden 40 µl RNase freies Wasser direkt auf die Säule pipettiert und die Säule bei mind. 8000 g für eine Minute zentrifugiert, wobei die RNA in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eluierte. Mit einem Photometer (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde die Gesamt-RNA-Konzentration bestimmt und das Eluat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

### 3.2.3.4 Reverse Transkription

Unter der reversen Transkription versteht man die Umschreibung (Transkription) von RNA in komplementäre DNA (cDNA, engl. „complementary DNA“), welche als Ausgangsmaterial für die nachfolgende quantitative PCR diente. Für die reverse Transkription der miRNA wurde das miScript II RT Kit von QIAGEN verwendet. Eine Menge von 1 µg Gesamt-RNA, in welcher die miRNA enthalten war, diente als Ausgangsmaterial für die Transkription. Um im weiteren Verlauf nur reife miRNA zu bestimmen, kam der miScript HiSpec Buffer zum Einsatz. Der Mastermix wurde analog der Zusammensetzung in Tabelle 10, ohne Zugabe von Wasser und RNA angesetzt. Die beiden fehlenden Komponenten wurden für jede Probe in der benötigten Menge zugegeben, sodass 1 µg RNA vorlag und das Gesamtreaktionsvolumen 20 µl betrug.

**Tabelle 10:** Mastermix Zusammensetzung für die reverse Transkription

Bestandteil	Volumen [µl]/Reaktion
5x miScript HiSpec Buffer	4
10x Nucleics Mix	2
RNase freies Wasser	variabel (je nach Konzentration der RNA)
miScript Reverse Transcriptase Mix	2
RNA	1 µg/Reaktion
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Zuerst lagert sich eine Poly-A Kette mit Hilfe der Poly-A-Polymerase an das 3' Ende der miRNA an. Im Anschluss kommt es zur Anlagerung des oligo-dT Adapters und der Umschreibung in cDNA durch die reverse Transkriptase. Nach einer Stunde bei 37°C, wird die Reaktion durch Hitzeinaktivierung der Transkriptase (95°C, 5 Minuten) beendet.

### 3.2.3.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (engl.: quantitative real-time PCR, qRT-PCR) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem DNA, z.B. erzeugt aus miRNA, amplifiziert werden kann und die genaue Menge der DNA in Echtzeit bestimmt wird. Dieses Verfahren wurde angewendet, um bestimmte in den HRMVECs enthaltene miRNAs zu quantifizieren und damit die Ergebnisse der Sequenzierung zu überprüfen.

Das miScript SYBR® Green PCR Kit kam hierbei zusammen mit dem Cyclo4 PTC-200 der Firma Biorad zum Einsatz. 2,5 µl der in der reversen Transkription erzeugten cDNA (Verdünnung 1:100, bzw. 1:10 je nach miRNA, siehe auch Tabelle 8) wurden zum Mastermix aus Tabelle 11 hinzugefügt.

**Tabelle 11:** Mastermix Zusammensetzung für die qPCR

Bestandteil	Volumen [µl]/Reaktion
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5
10x miScript Universal Primer	2,5
10x miScript Primer Assay	2,5
RNase freies Wasser	5
cDNA (dil)	2,5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25</b>

Nach jedem Zyklus (Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der Amplifizierungsschritte) wurde die Fluoreszenz gemessen, welche proportional zum gebildeten PCR-Produkt ist. Am Übergang zur exponentiellen Phase erfolgte die Quantifizierung.

## Präklinische Aspekte

**Tabelle 12:** qPCR Cycling Bedingungen; der Aktivierungsschritt wird benötigt, um die HotStar Taq DNA-Polymerase zu aktivieren; während der Denaturierung werden die DNA Doppelstränge aufgetrennt, an die sich in der Annealing Phase die Primer anlagern können. Während der Extensionsphase amplifiziert die DNA-Polymerase die DNA-Stränge.

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Zyklen
Initiale Aktivierung	15:00	95	1
Denaturierung	00:15	94	40
Annealing	00:30	55 (58*)	40
Extension	00:30	70	40
Schmelzkurve (Messung alle 0,2°C)	00:02	70-92	1

\*hsa-miR-1291 zeigte bei Verwendung einer Annealing Temperatur von 55°C einen Doppelpeak in der Schmelzkurve. Mit Hilfe eines Temperaturgradienten sah man, dass bei einer Annealing Temperatur von 58°C dieser Doppelpeak nicht vorhanden war.

Die gemessene Konzentration der DNA entspricht der Expression der miRNA. Zur Normalisierung diente die hsa-let-7e-5p, welche laut Sequenzierdaten in allen Proben gleichmäßig exprimiert wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des R-Packages „qpcR“ (<https://cran.r-project.org/web/packages/qpcR/index.html>), sowie der  $\Delta\Delta C_T$  Methode in Excel (Microsoft Corp., Redmond, USA).

### 3.2.3.6 Expression ausgewählter miRNAs im OIR-Modell

Die Expression bestimmter miRNAs (siehe Tabelle 8) wurde auch im Mausmodell der Sauerstoff induzierten Retinopathie (engl. oxygen induced retinopathy, OIR) mit Hilfe von qPCR überprüft. In diesem Modell kommt es durch die von außen induzierte Hyperoxie und daraus folgende relative Hypoxie zu einer vermehrten Ausschüttung von VEGF-A, was *in vivo* zu einer überschießenden Gefäßreaktion führt. Durch Überprüfung der in der Zellkultur unter angiogener Stimulation im Vergleich zur Hungerbedingung veränderten miRNAs im OIR-Modell, sollte untersucht werden, ob sich die *in vitro* Ergebnisse in ein *in vivo* Modell übertragen lassen.

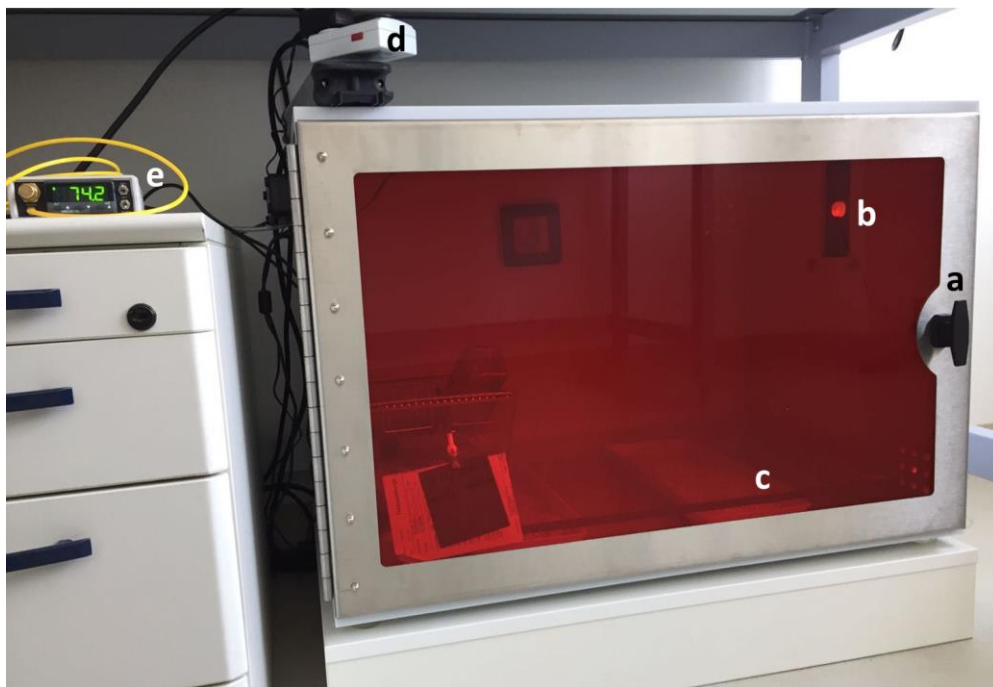
Auch für das Mausmodell ist eine Normalisierung auf eine kurze nicht codierende RNA nötig. Da hierfür keine Sequenzierdaten vorlagen, aus denen man die Sequenz mit der geringsten Beeinflussung im Modell berechnen hätte können, wurden verschiedene Sequenzen, welche häufig zur Normalisierung bei Experimenten mit miRNAs in Mäusen verwendet werden (SNORD-95, SNORD-72 und RNU-6), sowie Sequenzen, die in der Literatur als wenig beeinflusst gezeigt wurden (miR-16 in einem Rattenmodell (202) und miR-26b in neuronalen Zellen (203)), mittels qPCR für die verschiedenen Bedingungen überprüft. Dabei war die miR-16 über alle Gruppen hinweg am stabilsten exprimiert (siehe Anhang Abbildung 56) und wurde somit als Housekeeping Gen für die qPCR der Retina-Proben eingesetzt.

*OIR-Modell*

Im Oxygen induced retinopathy (OIR) Modell (51) werden die neugeborenen Mäuse am siebten postnatalen Tag (P7) zusammen mit ihrer Mutter in eine 75 %ige Sauerstoffatmosphäre umgesetzt, in der sie fünf Tage lang verbleiben. Die Mutter hat in dieser Zeit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Ab Tag 12 wird der Wurf wieder an normaler Raumluft gehalten. In dieser Phase kommt es in diesem Modell zur Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und in der Folge zur Bildung von Neovaskularisationen und Tufts. Diese haben ihren Höhepunkt an P17 (119). Die Quantifizierung der miRNAs erfolgte in diesem Versuchsaufbau bereits an P15, da davon ausgegangen werden muss, dass eine mögliche Änderung im miRNA Profil dem Phänotyp vorausgeht.

Die 75 %ige Sauerstoffatmosphäre wird in einem OIR-Inkubationsschrank (siehe Abbildung 13) mit medizinischem Sauerstoff erzeugt. Die Sauerstoff Konzentration wird dabei regelmäßig überprüft, wobei eine Schwankung von  $\pm 2 \%$  erlaubt ist. Sollte es zu größeren Schwankungen im Verlauf kommen, müssen diese Würfe verworfen werden.

Als Kontrollgruppe für die OIR-Tiere dienten Mäuse gleichen Alters, die an normaler Raumluft gehalten wurden (NOIR-Tiere).



**Abbildung 13:** OIR-Inkubationsschrank und seine Funktionalitäten. a) Öffnung des Inkubationsschranks; b) Zugang für ein externes Sauerstoffmessgerät; c) Wanne gefüllt mit CO<sub>2</sub> Absorber; d) Zeitschaltuhr zur Steuerung des Tag-Nacht-Rhythmus, e) Proox-Calibrator zur Regulation des O<sub>2</sub>-Zustroms.

## Präklinische Aspekte

### *Intravitreale Injektion*

Der Einfluss einer VEGF-Inhibition auf die Expression der betrachteten miRNAs *in vivo* wurde unter Verwendung von Eylea®, dem einzigen VEGF-Inhibitor, der murines VEGF bindet (191, 192), untersucht.

Nach Entnahme der Mäuse aus dem OIR-Inkubationsschrank an Tag 12, erfolgte die intravitreale Injektion durch Pei Pei Zhang. Zur intravitrealen Injektion unter Isofluran-Gasnarkose wurden die an Tag 12 noch geschlossenen Lider der Jungtiere durch Kratzen über die Lidspalte mit Hilfe einer Pinzette geöffnet. Um Einsicht auf den Fundus zu ermöglichen, wurden die Augen mit Neosynephrin-POS® 5 % Augentropfen und Mydrum® Augentropfen weitgetropft, sowie mit Corneregel® benetzt. Als Markierung der Injektionsstelle diente die Ora serrata, wobei auf den hinteren Augenpol gezielt wurde, um eine Verletzung der Linse zu vermeiden. Unter Sichtkontrolle am Operationsmikroskop (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE) wurde mit einer 34 GA Kanüle von Hamilton in ein Auge 0,5 µl Eylea® gespritzt, das Partnerauge diente als Kontrolle und erhielt dieselbe Menge an DPBS.

### *Präparation muriner Retinae für miRNA Isolation*

An Tag 15 wurden die Jungtiere unter Isoflurannarkose durch Dekapitation getötet und die Bulbi entnommen. Nach Entnahme der unfixierten Bulbi wurden der Sehnerv, sowie Fett- und Muskelreste von der Sklera entfernt. Die Cornea, Linse und der Glaskörper wurden durch einen kreisförmigen Schnitt entlang der Ora serrata vom hinteren Teil des Auges abgetrennt. Die Sklera wurde an einer beliebigen Stelle eingeschnitten und mit einer Pinzette festgehalten. Mit Hilfe einer zweiten Pinzette wurde die Retina aus der Sklera heraus geschoben (adaptiert nach Connor *et al.* (119)). Bis zur miRNA Extraktion wurde die Retina in RNAlater im Gefrierschrank (bei -80°C) aufbewahrt.

### *miRNA Extraktion aus Gewebe*

Die Retinae wurden aufgetaut, aus RNAlater in das QIAzol Lyse Reagens überführt und unter Anwendung von Ultraschall lysiert. Aus dem Lysat wurde die miRNA nach Anweisung des Herstellers extrahiert. (Das Protokoll entspricht dem Protokoll für miRNA Extraktion aus Zellen; siehe hierzu auch Abschnitt 3.2.3.3).

### **3.2.3.7 *In silico* Analyse der miRNA Targets**

Um zu untersuchen, welche potentiellen Targets die miRNAs haben, die durch die beiden gesetzten Schwellen als möglicherweise interessant identifiziert wurden, wurden verschiedene computergestützte (*in silico*) Auswertungen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die Plattform miRWalk 2.0



(<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) verwendet, um validierte Targets für miRNAs zu identifizieren. Diese Target-Listen wurden in SPSS von Duplikaten bereinigt und einer Gene Ontology Enrichment Analyse für biologische Prozesse (<http://geneontology.org/>) unterzogen. Bei dieser Analyse wird festgestellt, wie viele der vorgegebenen Gene (als Targets bestimmter miRNAs) einem bestimmten Gene Ontology (GO) Begriff zugeordnet werden (z.B. acht aus einer Liste von 22 Genen). Dieser Quotient wird verglichen mit der relativen Häufigkeit dieses GO Begriffs in der Referenzliste, z.B. Gene des Homo sapiens (z.B. 874 aus 20972). Der Vergleich dieser beiden Brüche gibt an, ob ein GO Begriff in der vorgegebenen Gen-Liste vermehrt (engl. enriched), oder weniger häufig vorkommt. Die Beispielzahlen ergeben z.B. ein Fold Enrichment von 8,73 (8 aus 22 vs. 874 aus 20972).

### **3.2.3.8 Exemplarische Untersuchung des Effekts der miR-335-5p auf das Sphäroid-Angiogenesemodell**

#### *Etablierung der Lipotransfektion von HRMVECs mit der Kontroll-miRNA cel-miR-39-3p*

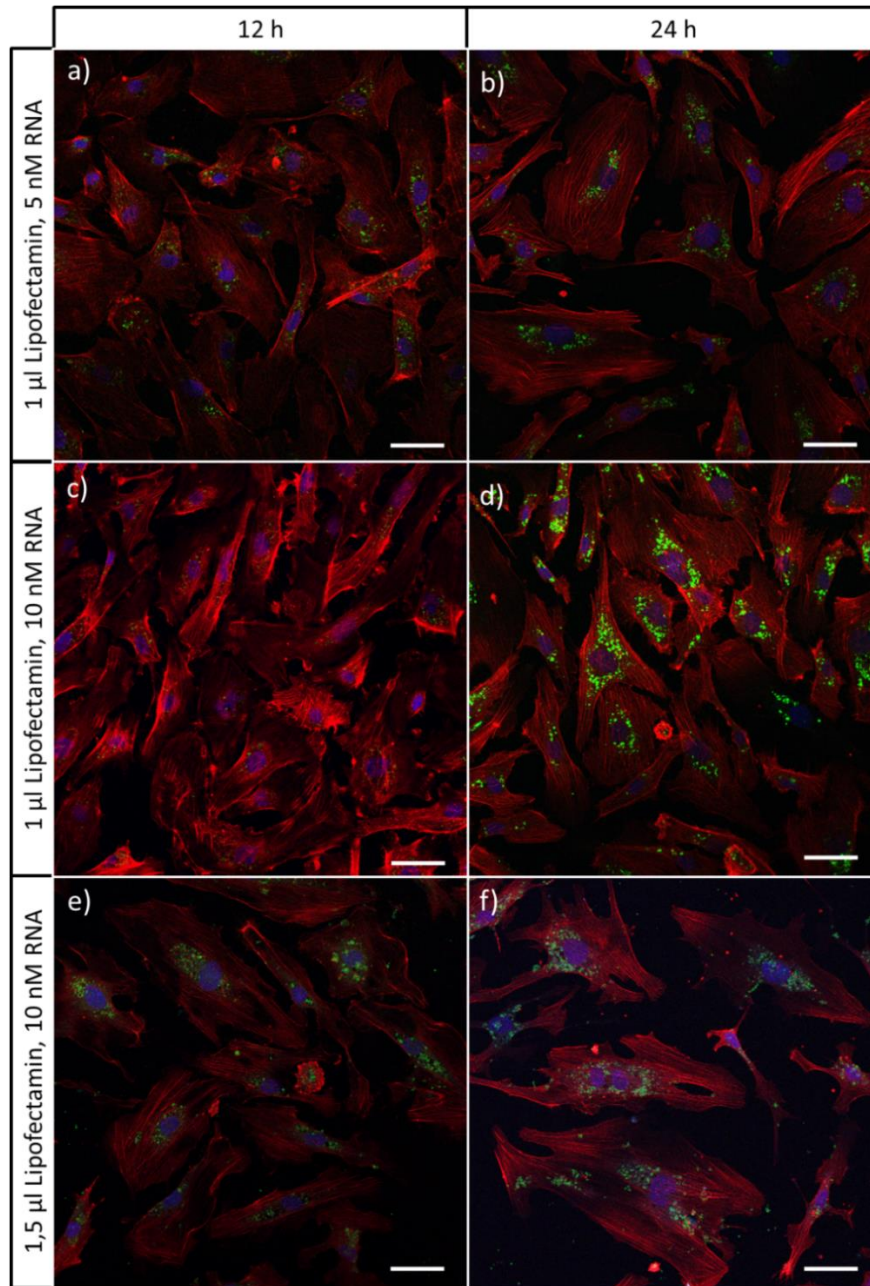
Unter „microRNA-Mimics“ versteht man modifizierte RNA-Stränge, die wie der Name sagt, die endogenen miRNAs nachahmen. Dadurch ermöglichen sie die funktionelle Untersuchung der jeweiligen miRNAs.

Sowohl die Kontroll-miRNA (cel-miR-39-3p), als auch die in den späteren Versuchen verwendete miRNA (hsa-miR-335-5p) waren 6-FAM<sup>TM</sup> Fluorescein markiert, sodass die Kontrolle der Transfektion mittels Konfokalmikroskop (DMI8, Leica Microsystems GmbH, Deutschland) erfolgen konnte. Da die Methode der Lipotransfektion in unserem Labor bisher noch nicht eingesetzt worden war, wurde im ersten Schritt die Lipotransfektion von HRMVECs unter Verwendung der Kontroll-miRNA cel-miR-39-3p etabliert. Dies erfolgte in Anlehnung an das Lipofectamine® 2000 Reagent Protokoll, wobei die Menge des eingesetzten Lipofektamins, die eingesetzte miRNA Menge, sowie die Zeit der Transfektion variiert wurden. Die besten Ergebnisse waren mit einer Transfektionszeit von 24 h, 1 µl Lipofektamin und einer miRNA Konzentration von 10 nM erzielt worden (siehe auch Abbildung 14). Der Einsatz von 1,5 µl Lipofektamin führte zu vermehrtem Absterben der Zellen und sowohl eine miRNA Konzentration von 5 nM, als auch eine Transfektionszeit von nur 12 h resultierten in einer geringeren Transfektionsrate, als die Transfektion für 24 h mit 10 nM miRNA (erkennbar an der geringeren Fluoreszenz).

Das Zytoskelett, sowie der Zellkern wurden zusätzlich markiert. Hierfür wurden die Zellen zuerst für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, 5 min. mit PBS gewaschen und für eine Stunde mit Tritc-

## Präklinische Aspekte

markiertem Phalloidin gefärbt (1:500 in 1 % Normal Goat Serum). Nach drei Waschschritten à 10 Minuten mit PBS wurden die Zellen mit Dapi-Mowiol eingedeckelt.

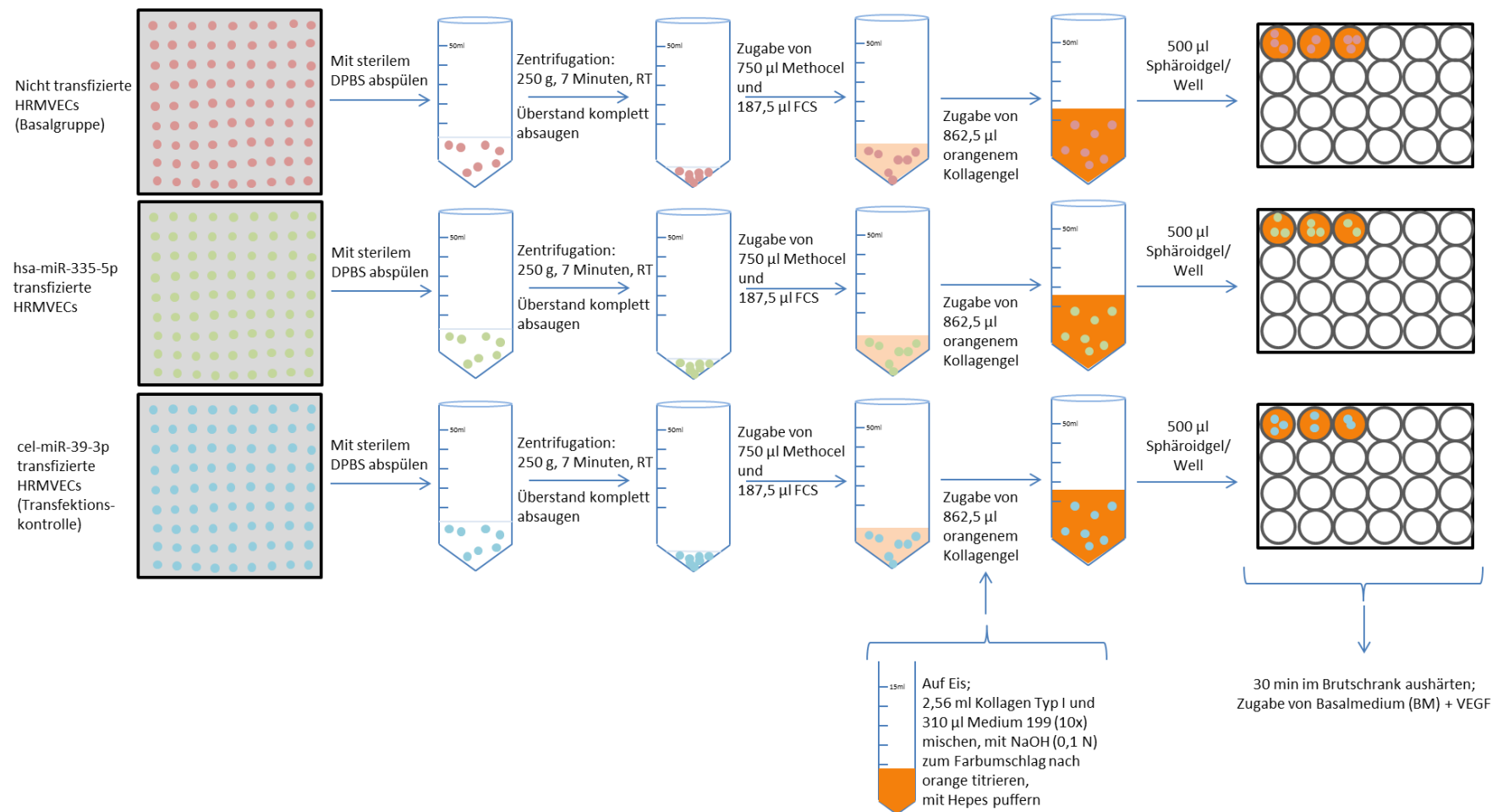


**Abbildung 14:** Mikroskopische Kontrolle der Transfektion bei Methodenetablierung der Lipotransfektion von HRMVECs. In der linken Spalte verblieb das Transfektionsmedium für 12 h auf den Zellen, in der rechten Spalte für 24 h; in a) und b) enthielt das Transfektionsmedium 1 µl Lipofectamin und 5 nM RNA, in c) und d) 1 µl Lipofectamin und 10 nM RNA, in e) und f) 1,5 µl Lipofectamin und 10 nM RNA. Der weiße Balken entspricht 50 µm; rot: Phalloidin, blau: Dapi, grün: FAM<sup>TM</sup> markierte microRNA-Mimic.

*Sphäroidversuch mit transfizierten Zellen*

Im gewählten Versuchsansatz wurden 80-90 % konfluente HRMVECs mit der microRNA-Mimic der hsa-miR-335-5p oder der Kontroll miRNA cel-miR-39-3p per Lipotransfektion transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden dann zu Sphäroiden geformt und in einem Kollagengel eingebettet mit rekombinantem VEGF-A stimuliert.

In einem regulären Sphäroidassay, wie er im Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben ist, wird nur eine Zellart verwendet und die Art der Stimulation im Sproutingassay (Abschnitt 3.2.2.2) variiert. Da die Dichte des Sphäroidgels einen sehr großen Einfluss auf das Sprossverhalten der Sphäroide hat, können Sphäroide, die in verschiedenen Versuchen beobachtet werden, nur schlecht miteinander verglichen werden. Um im Sphäroidassay verschiedene Arten von Zellen (nicht transfiziert, bzw. mit hsa-miR-335-5p oder cel-miR-39-3p transfiziert) miteinander vergleichen zu können, musste somit der Sphäroidassay entsprechend angepasst werden (siehe Abbildung 15). So wurden die nicht transfizierten, die mit hsa-miR-335-5p und mit cel-miR-39-3p transfizierten Zellen nacheinander getrennt trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und in die hängenden Tropfen überführt. Nach ca. 24 h wurden die Sphäroide getrennt mit DPBS abgespült und zentrifugiert, im Anschluss wurde Methocel und FCS zugegeben. Parallel zur Zentrifugation wurde das Gel auf Eis vorbereitet, 862,5 µl davon zur Sphäroid-Suspension der Basalgruppe gegeben und je 500 µl des Sphäroidgels pro Well einer 24-Well-Platte aufgeteilt (insgesamt drei Wells pro Gruppe). Der Rest des Gels verblieb in der Zwischenzeit auf Eis, sodass es nicht vorzeitig aushärtete und die Konsistenz vergleichbar blieb. Für jede Gruppe wurde eine extra Platte verwendet, da in Vorversuchen festgestellt worden war, dass die Sphäroide zum Teil, wahrscheinlich aufgrund der deutlich längeren Wartezeit als im regulären Sproutingassay, auf den Boden der Wellplatte absanken und dadurch nicht mehr auswertbar waren. Ebenso wurde mit den anderen beiden Gruppen verfahren. Nach etwa 30 min Aushärten im Brutschrank wurden 100 µl Basalmedium, welches mit rekombinantem VEGF versetzt war, auf das Gel gegeben. Nach etwa 15 h wurden die Sphäroide ausgewertet.

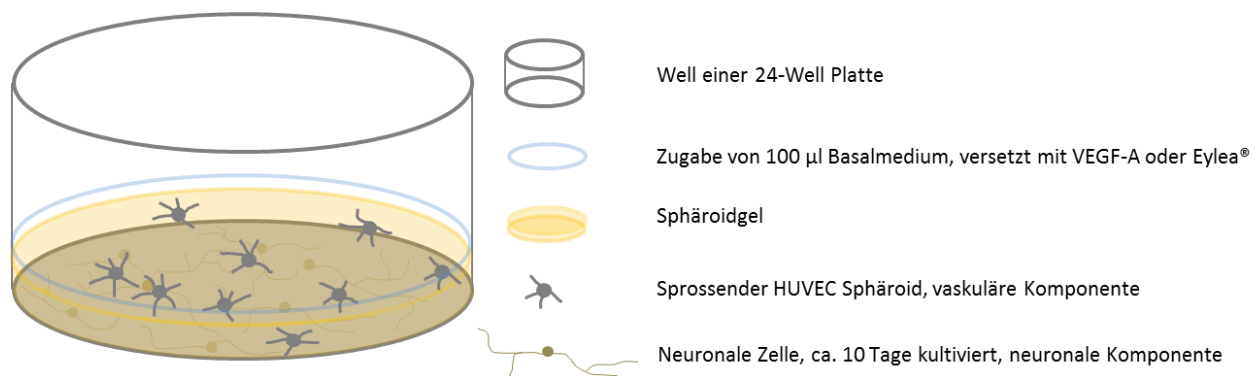


**Abbildung 15:** Versuchsaufbau des angepassten Sphäroidassays zum Vergleich untransfizierter HRMVECs mit HRMVECs, die mit hsa-miR-335-5p, bzw. cel-miR-39-3p transfiziert wurden.

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Etablierung eines *in vitro* Modells für das neuro-vaskuläre Interface

Die Interaktion neuronaler Zellen mit Endothelzellen spielt bei der Entstehung des Krankheitsbilds der Frühgeborenenretinopathie eine zentrale Rolle. Um diese Interaktion und den Einfluss einer VEGF-Inhibition *in vitro* untersuchen zu können, sollte ein Modell dafür entwickelt werden. Der neuronale Part wird von primären, retinalen, neuronalen Zellen übernommen, die unter Zuhilfenahme des Papain Dissociation Systems von Worthington aus adulten Mäuseretinae gewonnen und kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit einem Endothelzellsphäroid-Gel überschichtet, wobei Endothelzell-Sphäroide sensibel auf angiogene Stimulation mit der Bildung von radialen, gefäßähnlichen Sprossungen reagieren (116-118) und somit die vaskuläre Komponente im Modell übernehmen (graphisch dargestellt in Abbildung 16).



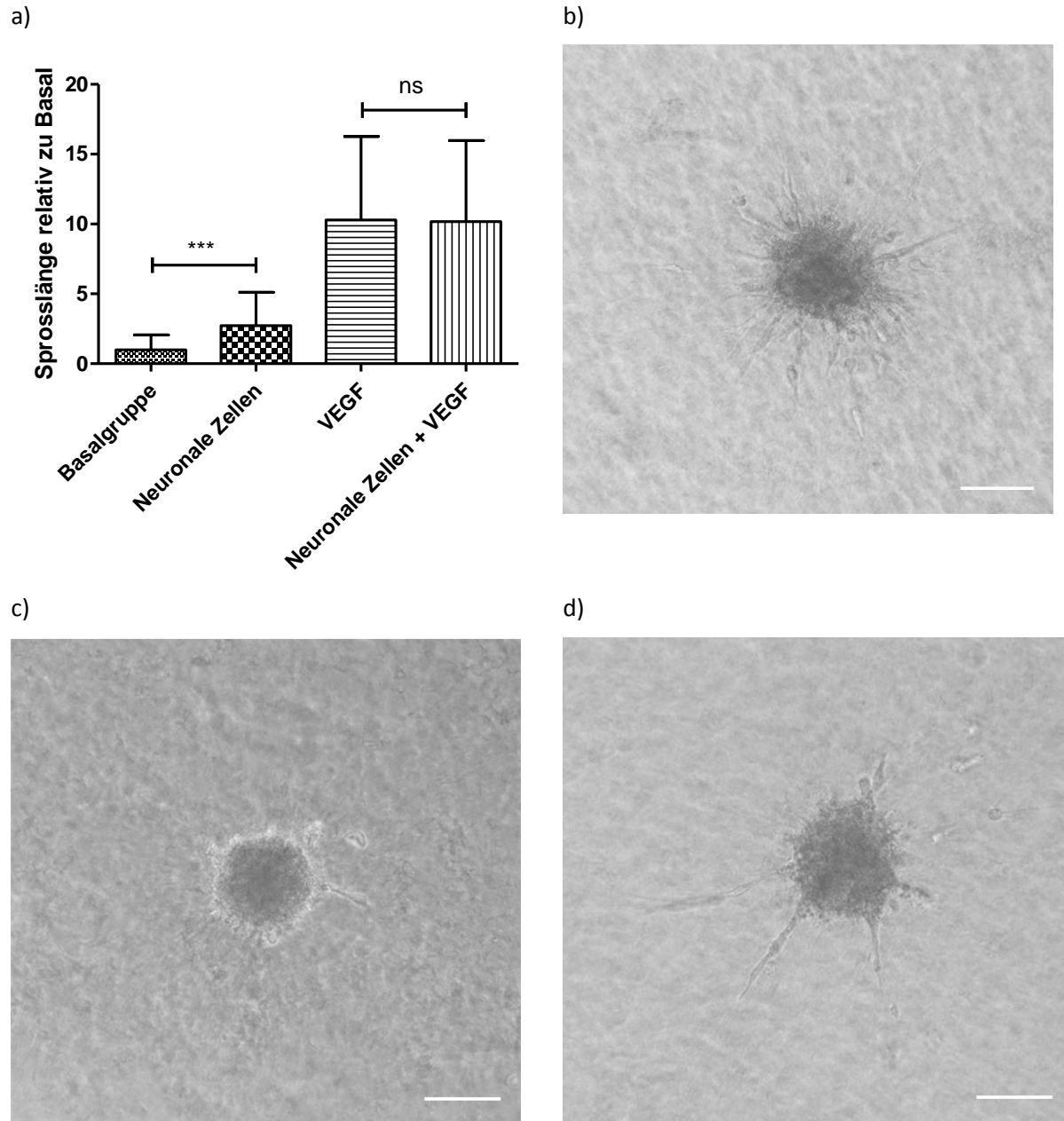
**Abbildung 16:** Graphische Darstellung des *in vitro* Modells für das neuro-vaskuläre Interface. Die primäre, retinale, neuronale Zellkultur übernimmt den neuronalen Part im Modell, während die Endothelzellsphäroide den vaskulären Teil übernehmen.

##### 3.3.1.1 Beeinflussung sphäroidaler Sprossung durch ko-kultivierte primäre retinale Zellen

Zu Beginn sollte untersucht werden, ob die *in vivo* gesehene Stimulation von Gefäßwachstum durch neuronale Zellen auch *in vitro* nachgeahmt werden kann. Hierfür wurde in einer ersten Sphäroid-Versuchsreihe überprüft, ob die Anwesenheit der über zehn Tage kultivierten neuronalen Zellen zu einer Stimulation von HUVEC Sphäroiden und damit einhergehend zu vermehrter radialer Sprossung führt. Außerdem wurde untersucht, ob die neuronalen Zellen eine Stimulation von außen durch Zugabe von rekombinantem VEGF-A beeinflussen. Die Reaktion der Sphäroide auf eine Stimulation wurde durch Vermessung der kumulativen Länge aller Aussprossungen eines jeden auswertbaren Sphäroids einer Gruppe bestimmt. Sphäroide, welche unmittelbar nebeneinander oder am Rand des Wells lagen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da sich Sphäroide bei zu starker Nähe gegenseitig beeinflussen

## Präklinische Aspekte

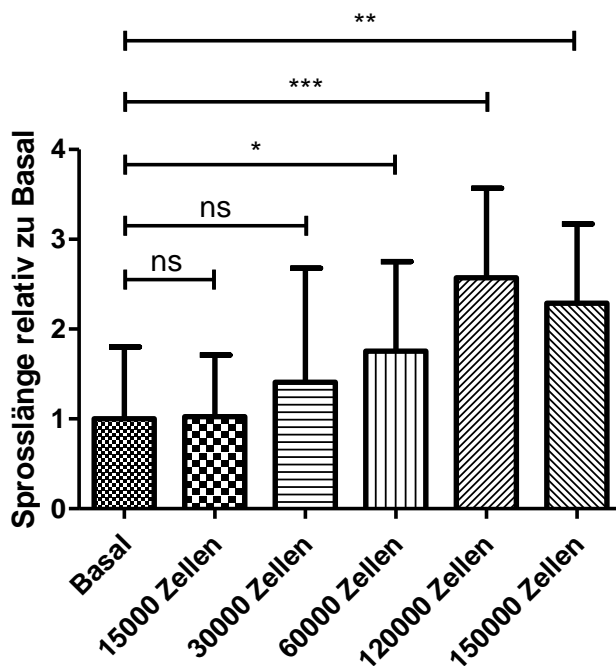
können und auch der Well-Rand einen Einfluss auf die Aussprossungen haben kann. Die Gesamtlänge der Aussprossungen jedes Sphäroids wurde durch den Mittelwert der Länge der Aussprossungen in der jeweiligen Basalgruppe geteilt, um der Tatsache gerecht zu werden, dass sich die Gelkonsistenz von Versuch zu Versuch unterscheiden kann. Durch dieses Vorgehen können mehrere Versuche gemeinsam ausgewertet und verglichen werden. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit der neuronalen Zellen unter den Endothelzellsphäroiden zu einer statistisch hoch signifikanten ( $p < 0,001$ , t-Test) Stimulation der Sphäroide führte, wobei diese jedoch deutlich geringer ausfiel als die Stimulation, die aus einer Zugabe von rekombinantem VEGF-A resultierte. Die Stimulation durch zugegebenes rekombinantes VEGF-A wurde durch die Anwesenheit von neuronalen Zellen unter dem Gel nicht beeinflusst ( $p = 0,9275$ , t-Test) (siehe auch Abbildung 17a).



**Abbildung 17:** Einfluss neuronaler Zellen auf das Sprossverhalten von Endothelzellsphäroiden. a) Die Anwesenheit von neuronalen Zellen führt zu einer statistisch hoch signifikanten ( $p < 0,001$ , t-Test) Stimulation der Endothelzellsphäroide. Die Stimulation durch extern zugegebenes rekombinantes VEGF-A wurde durch die neuronalen Zellen nicht beeinflusst. b) Sphäroid, der mit VEGF-A stimuliert wurde als Beispiel für die deutliche Induktion der Sprossung durch rekombinantes VEGF-A; c) Basalsphäroid zur Verdeutlichung der kaum vorhandenen Basalsprossung der Sphäroide; d) Sphäroid, der in einem Gel über neuronale Zellen geschichtet wurde, was zu einer Induktion der Sprossung führte; der weiße Balken entspricht einer Länge von 100  $\mu\text{m}$ .

## Präklinische Aspekte

In weiteren Versuchen wurden die neuronalen Zellen in verschiedenen Dichten ausgesät (15.000, 30.000, 60.000, 120.000 und 150.000 Zellen je Well einer 24-Well Platte) und wieder nach 10-tägiger Kultivierung mit Endothelzellsphäroiden überschichtet (siehe auch Abschnitt 3.2.2.2). Die basale Sprosslänge bei diesem Versuch zur Dichteabhängigkeit der neuronalen Zellen lag bei  $48,80 \pm 38,40 \mu\text{m}$ . Die Anwesenheit neuronaler Zellen führte ab einer Konzentration von 60.000 Zellen/Well zu einer signifikant gesteigerten Sprossung auf das 1,76-fache ( $p \leq 0,05$ ) bzw. das 2,57-fache ( $p \leq 0,001$ ) bei 120.000 Zellen (siehe Abbildung 18; One-way-ANOVA). Ab 120.000 neuronalen Zellen kam es zur Sättigung des stimulativen Effekts, weshalb für die weiteren Versuche eine Dichte von 120.000 Zellen/Well gewählt wurde.



**Abbildung 18:** Kumulative Länge sphäroidaler Aussprossungen in Abhängigkeit von der Dichte, der darunter kultivierten neuronalen Zellen. Als Basalgruppe dienten Wells, welche mit Poly-L-Lysin und Laminin beschichtet und während der Zeit der Kultivierung der neuronalen Zellen ebenfalls mit neuronalem Wachstumsmedium befüllt waren. Überschichtung des Sphäroidgels erfolgte in allen Gruppen mit Basalmedium ohne Wachstumsfaktoren. Die Gesamtsprosslänge eines jeden Sphäroids wurde durch den Mittelwert der basalen Sprossung geteilt, sodass im Folgenden immer von einer relativen Sprosslänge bezogen auf die Basalgruppe gesprochen wird. (One-way ANOVA, ns:  $p > 0,05$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ )

### 3.3.1.2 Einfluss von VEGF-Inhibition auf die neuro-vaskuläre Interaktion von primären retinalen Zellen mit Endothelzellsphäroiden

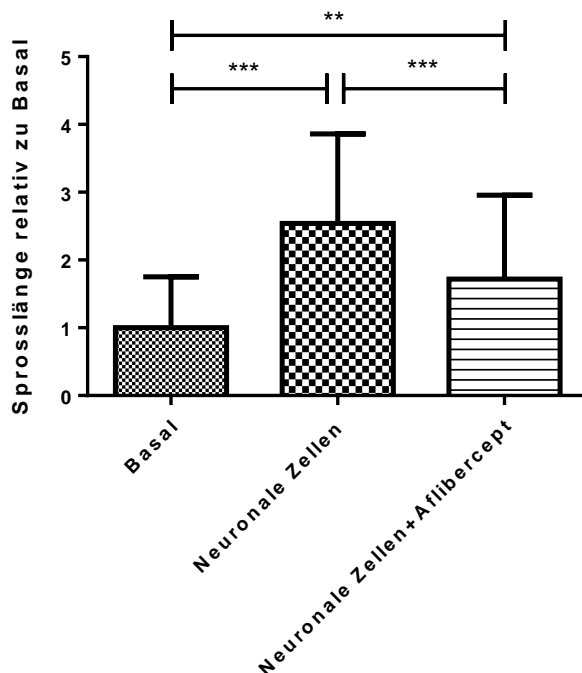
In einer weiteren Versuchsreihe sollte der Effekt von VEGF-Inhibition auf die durch murine neuronale Zellen induzierte Sprossung untersucht werden. Da Aflibercept der einzige VEGF-Inhibitor ist, der auch murines VEGF-A bindet (191, 192), konnte in diesem Versuchsansatz nur dieser Inhibitor verwendet



werden. Bei Aflibercept handelt es sich um ein Fusionsprotein, welches aus Teilen der humanen VEGF-Rezeptoren 1 und 2, sowie dem Fc-Teil des menschlichen IgG1 besteht (139).

Versuche, in denen die Anwesenheit der neuronalen Zellen ohne erkennbaren Grund nicht zu einem vermehrten Sprossverhalten führte (Versagen der Positivkontrolle), wurden von der Gesamtauswertung ausgeschlossen.

Die Anwesenheit der neuronalen Zellen verursachte auch in diesen Versuchen im Durchschnitt eine 2,54-fache Sprossung im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p \leq 0,001$ , One-way ANOVA). Der Wirkstoff Aflibercept bindet VEGF-A und auch PlGF, welche, falls vorhanden, dem System quasi entzogen werden und keine Bindung zu ihren Rezeptoren eingehen können. Die Sprossung wurde durch Aflibercept signifikant ( $p \leq 0,001$ , One-way ANOVA) reduziert und betrug nur noch das 1,72-fache der Kontrollgruppe, jedoch wurde die Sprossung nicht komplett auf Basalniveau abgesenkt ( $p \leq 0,01$ , One-way ANOVA), was für einen weiteren angiogenen Faktor neben VEGF-A und PlGF spricht, welcher von den neuronalen Zellen exprimiert wird.



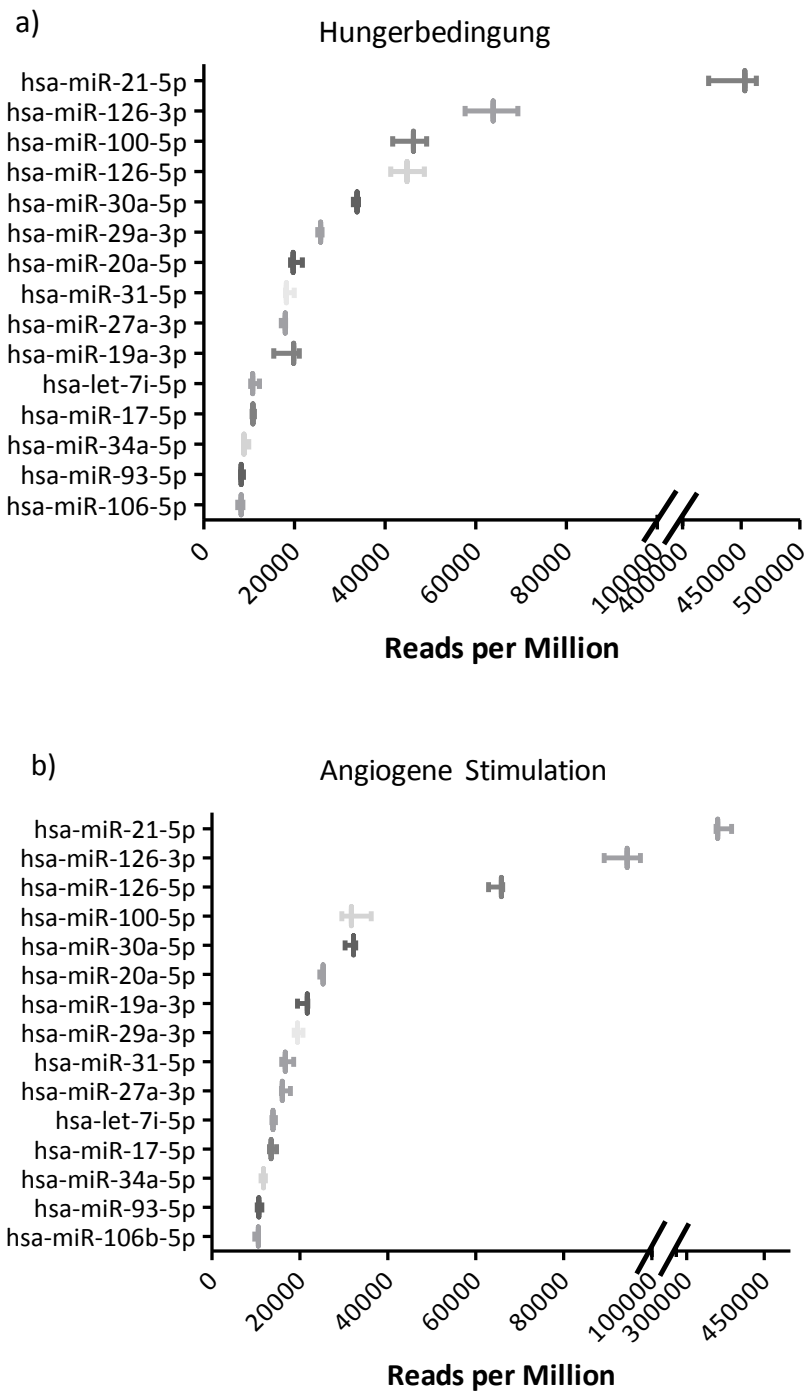
**Abbildung 19:** Auswirkung der VEGF-Inhibition auf die durch neuronale Zellen induzierte Sprossung. Die Anwesenheit von neuronalen Zellen (120.000 Zellen je Well) führte im Durchschnitt zu einer Steigerung der Sprossung auf das 2,54-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch die zusätzliche Anwesenheit von Aflibercept wurde der Effekt der neuronalen Zellen signifikant auf das 1,72-fache der Kontrollgruppe, jedoch nicht auf Basalniveau reduziert (signifikanter Unterschied Basalgruppe vs. Neuronale Zellen und Aflibercept ( $p \leq 0,01$ ; One-way ANOVA).

### **3.3.2 miRNA Expressionsprofil retinaler Endothelzellen unter Hungerbedingung im Vergleich zu angiogener Stimulation mit und ohne VEGF-Inhibition**

#### **3.3.2.1 Next Generation Sequencing (NGS)**

In den Proben konnten im Durchschnitt  $4.549.693 \pm 753.110$  Sequenzen einer Position im humanen Genom (GRCh38/hg38) zugeordnet werden, wobei die Übereinstimmungsquote im Mittel bei 94,22 % lag. Betrachtet man nur die miRNA Sequenzen, waren im Durchschnitt  $1.611.242 \pm 343.231$  miRNA Kopien je Probe enthalten. Die 15 am häufigsten exprimierten miRNAs sind in Abbildung 20 exemplarisch für die Gruppen Hungerbedingung sowie angiogene Stimulation dargestellt. Die hsa-miR-21-5p machte unabhängig von der Art der Stimulation in allen Gruppen fast die Hälfte des gesamten miRNoms aus (man beachte die unterbrochene X-Achse), während die anderen miRNAs maximal 100.000 Reads per Million (gelesene Sequenzen pro eine Million Sequenzen, insgesamt also ca. 10 % des miRNoms) ausmachten, bzw. die Expression noch weit darunter lag.

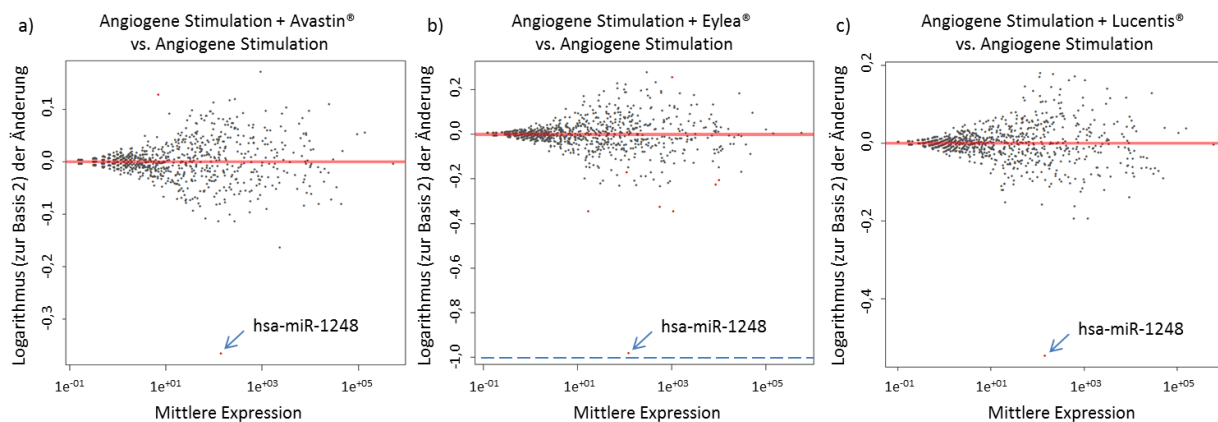
Unter Hungerbedingung fanden sich im Durchschnitt 789 verschiedene miRNAs, in der Gruppe der angiogenen Stimulation 818, nach Zugabe von Avastin® 821, von Eylea® 824 und von Lucentis® 852, welche mindestens einmal je Probe vorkamen.



**Abbildung 20:** Die 15 häufigsten miRNAs, die mind. 1 % des miRNoms ausmachten, exemplarisch dargestellt für a) die Gruppe der Hungerbedingung und b) der angiogenen Stimulation. Die hsa-miR-21-5p war in allen Gruppen am stärksten exprimiert und stellte fast die Hälfte des miRNoms, während die anderen miRNAs maximal 100.000 Reads per Million (also max. 10 %) ausmachten, bzw. die Expression noch weit darunter lag.

## Präklinische Aspekte

Vergleicht man die stimulierten, bzw. die nach 12 h Stimulation zusätzlich inhibierten Gruppen miteinander, waren zwischen den Gruppen Angiogene Stimulation (AS) + Avastin®, sowie AS + Lucentis® im Vergleich zur reinen angiogenen Stimulation eine miRNA (hsa-miR-1248) sowie zwischen AS + Eylea® und der reinen AS zwei miRNAs (hsa-miR-1248 und hsa-miR-376a-3p) statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$  bei Benjamini-Hochberg (BH) Anpassung für multiples Testen, DESeq2) unterschiedlich exprimiert. Vergleicht man die einzelnen VEGF-Inhibitoren untereinander, so lag nur beim Vergleich AS + Eylea® vs. AS + Avastin® eine signifikant geringere Expression der miRNA hsa-miR-1248 in der Gruppe AS + Eylea® vor.



**Abbildung 21:** Vergleich der miRNA Expression unter angiogener Stimulation (12 h) und anschließender VEGF-Inhibition (12 h) im Vergleich zur reinen angiogenen Stimulation für 24 h (die blaue gestrichelte Linie (nur in b sichtbar) zeigt die Grenze der definierten relevanten Veränderung an, wobei keine der signifikant veränderten miRNAs auch relevant (mind. 2-fach) verändert ist)

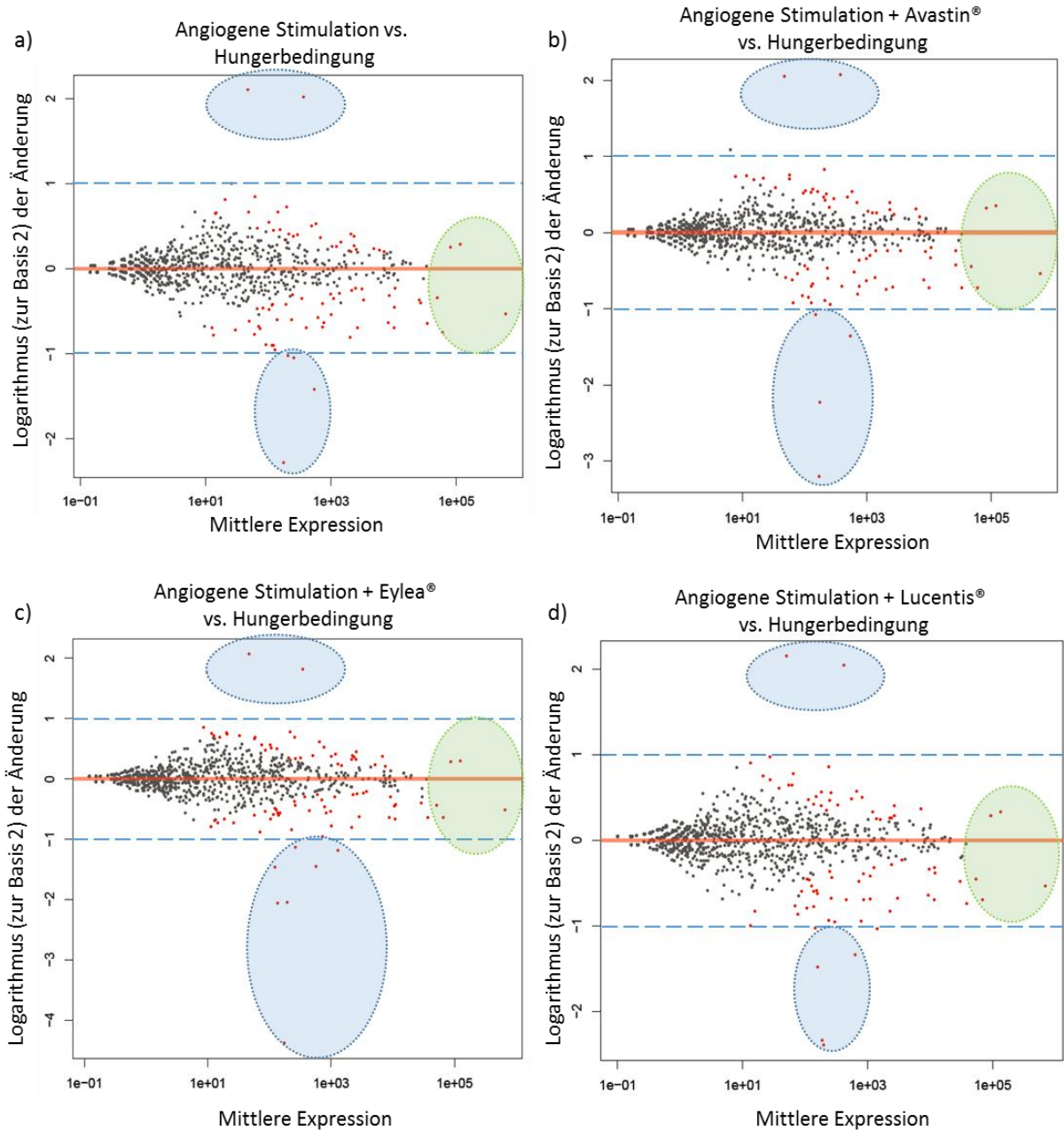
Im Vergleich zur Hungerbedingung waren in der Gruppe der AS 67 miRNAs statistisch signifikant verändert, ebenfalls 67 miRNAs in der Gruppe der AS + Avastin®, 69 miRNAs in der Gruppe der AS + Eylea® und 65 bei der AS + Lucentis®. Dabei kamen 42 miRNAs in allen Gruppen vor, während weitere 53 miRNAs jeweils in mindestens einem der Vergleiche auftraten (eine Übersicht über die verschiedenen miRNAs ist im Anhang in Tabelle 30 zu finden).

Relativ viele miRNAs sind in dieser Betrachtung statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Gruppen exprimiert. Eine statistisch signifikante Änderung ist jedoch nicht immer gleichbedeutend mit einer relevanten Expressionsänderung. In Anlehnung an Loscher *et al.* wurden erst mindestens 2-fache Änderungen, entsprechend einer Verdoppelung oder Halbierung der Expression, näher betrachtet (204). Diese Änderungen wurden als relevante Änderungen definiert (graphisch dargestellt in Abbildung 21 und Abbildung 22 durch die blau gestrichelten Linien; aufgrund der

logarithmischen Skalierung zur Basis 2 der Y-Achse bei +1, bzw. -1). In Abbildung 22 sind die miRNAs, die eine relevante Veränderung zeigten, durch die blauen Schattierungen markiert.

Daneben fallen außerdem miRNAs auf, welche im Mittel sehr häufig und ebenfalls signifikant unterschiedlich zwischen den Bedingungen exprimiert waren, bei denen die Expressionsänderungen jedoch unterhalb des gesetzten Schwellenwerts für Relevanz lagen (Abbildung 22; markiert durch die grünen Schattierungen).

Da bisher nicht bekannt ist, wie groß die Expressionsänderung einer miRNA sein muss, um auch eine klinische Relevanz zu haben, wurde, wie bereits erwähnt, der in dieser Arbeit verwendete Schwellenwert in Anlehnung an Loscher *et al.* gewählt (204). Es gibt jedoch auch andere Arbeiten, die bereits geringere Änderungen näher untersuchen (205). Aus diesem Grund sollten zusätzlich noch die miRNAs weiter betrachtet werden, die besonders stark exprimiert waren, jedoch nur Expressionsunterschiede unterhalb des Schwellenwerts aufwiesen. Diese wurden durch Setzen eines weiteren Thresholds identifiziert: sie sollten mind. 1 % des miRNoms ausmachen, sowie eine signifikante Veränderung ( $p \leq 0,05$ , DESeq2) um mindestens 15 % im Vergleich zur Hungerbedingung aufweisen.



**Abbildung 22:** Übersicht über die zwischen den Gruppen unterschiedlich exprimierten miRNAs aufgetrennt nach den vier Vergleichen a) angiogene Stimulation (AS) vs. Hungerbedingung, b) AS + Avastin® vs. Hungerbedingung, c) AS + Eylea® vs. Hungerbedingung und d) AS + Lucentis® vs. Hungerbedingung. Jeder Punkt steht für eine miRNA. Die roten Punkte stellen die miRNAs dar, bei denen der angepasste p-Wert (Benjamini-Hochberg (BH) Korrektur für multiples Testen) des Expressionsunterschieds  $< 0,1$  war. Eine Änderung der Expression um mehr als „1“ auf der X-Achse entspricht einer mind. 2-fachen Expressionsänderung, welche als relevante Änderung definiert wurde. Dieser Schwellenwert ist in der Abbildung durch die gestrichelten hellblauen Linien gekennzeichnet. Punkte nahe der roten Linie stehen für die miRNAs, welche sich zwischen den verglichenen Gruppen kaum geändert haben. Die miRNAs, welche durch die hellblauen Schattierungen markiert sind, haben sich statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ , BH Korrektur, DESeq2) und relevant (mind. 2-fach) zwischen den Bedingungen geändert. Die grünen Schattierungen markieren die miRNAs, welche stark exprimiert wurden (mind. 1 % des miRNoms) und signifikant ( $p \leq 0,05$ , BH Korrektur, DESeq2) um mind. 15 % in einer der Gruppen im Vergleich zur Hungerbedingung verändert waren.

*Relevant veränderte miRNAs*

Beim Vergleich der angiogenen Stimulation inklusive anschließender partieller Hemmung dieser durch Zugabe der verschiedenen VEGF-Inhibitoren mit der reinen angiogenen Stimulation war keine der statistisch signifikant veränderten miRNAs auch relevant verändert. Auch der Vergleich zwischen den VEGF-Inhibitoren zeigte keine relevant unterschiedlich exprimierte miRNA.

Im Vergleich zur Hungerbedingung waren in allen Gruppen von den 65 bis 69 statistisch signifikanten miRNAs jeweils nur zwei miRNAs (hsa-miR-139-5p und hsa-miR-139-3p) auch relevant vermehrt exprimiert. Durch die AS + Eylea® waren sieben, durch die AS + Lucentis® sechs, durch die AS + Avastin® vier und durch die reine AS ebenfalls vier miRNAs im Vergleich zur Hungerbedingung signifikant und relevant weniger exprimiert (siehe Tabelle 13 und Abbildung 23).

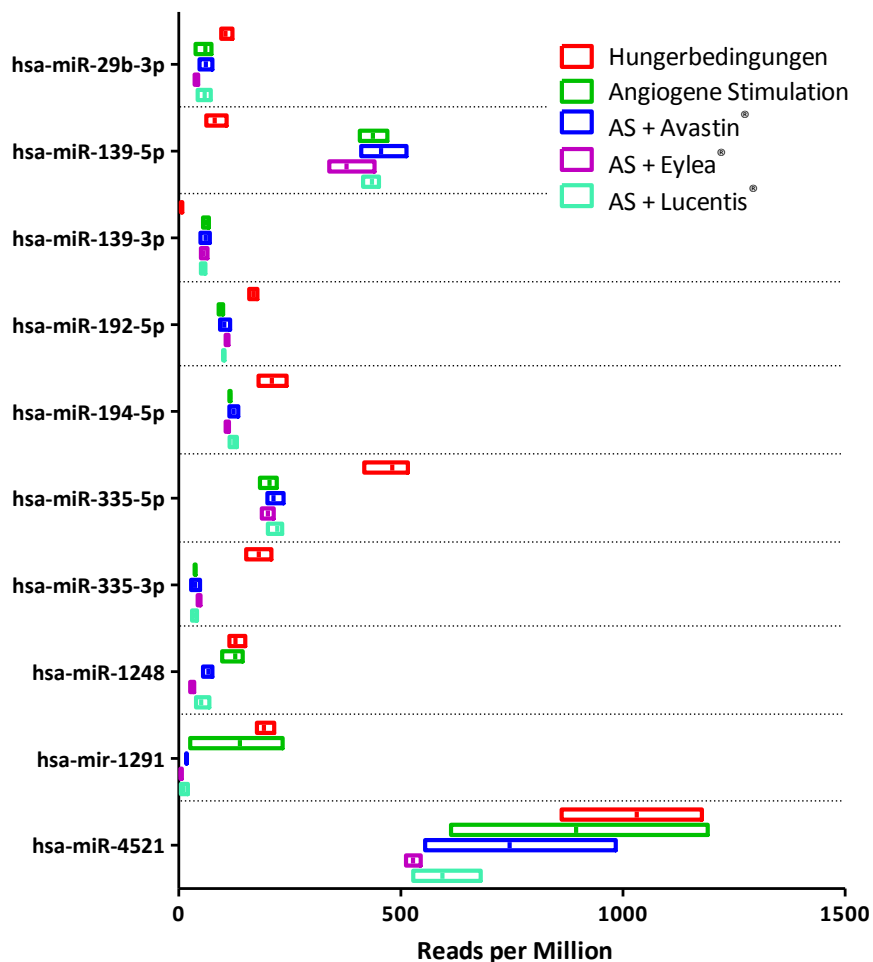
**Tabelle 13:** Übersicht über die signifikant und relevant veränderten miRNAs. Im Vergleich zur angiogenen Stimulation (AS) waren ein bis zwei miRNAs statistisch signifikant, jedoch nicht relevant unterschiedlich exprimiert. Im Vergleich zur Hungerbedingung waren 67 miRNAs in der Gruppe der AS signifikant verändert, ebenfalls 67 zwischen AS + Avastin® und Hungerbedingung, 69 zwischen AS + Eylea® und Hungerbedingung und 65 zwischen AS + Lucentis® und Hungerbedingung unterschiedlich exprimiert. In allen Gruppen waren zwei miRNAs relevant vermehrt und vier bis sieben miRNAs weniger exprimiert im Vergleich zur Hungerbedingung.

Behandlungsgruppe	Anzahl statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , DESeq2) veränderter miRNAs	Anzahl relevant (mind. 2-fach) vermehrt exprimierter miRNAs	Anzahl relevant (mind. 2-fach) weniger exprimierter miRNAs
<b>im Vergleich zur Angiogenen Stimulation (AS)</b>			
AS + Avastin®	1	0	0
AS + Eylea®	2	0	0
AS + Lucentis®	1	0	0
<b>im Vergleich zur Hungerbedingung</b>			
AS	67	2	4
AS + Avastin®	67	2	4
AS + Eylea®	69	2	7
AS + Lucentis®	65	2	6

Bei Kombination der relevanten Expressionsänderungen aus diesen Vergleichen erhielt man insgesamt zehn miRNAs, welche durch die einzelnen Stimulationsbedingungen im Vergleich zur Hungerbedingung signifikant und relevant entweder vermehrt oder weniger exprimiert wurden. Da im Vergleich zur Angiogenen Stimulation (AS) keine der miRNAs in einer der anderen Gruppen eine relevante Veränderung zeigte, wurde dieser Vergleich im Weiteren nicht mehr herangezogen. Die NGS-Daten zeigten, dass die beiden miRNAs hsa-miR-139-5p, sowie hsa-miR-139-3p vermehrt, die miRNAs hsa-miR-

## Präklinische Aspekte

29b-3p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-335-5p und hsa-miR-335-3p in allen vier Gruppen weniger exprimiert wurden. Die miRNAs hsa-miR-1248, hsa-miR-1291 sowie hsa-miR-4521 waren nur in einzelnen Gruppen signifikant geringer exprimiert als unter Hungerbedingung und schwankten zum Teil deutlich zwischen den biologischen Replikaten. Für hsa-miR-1291 zeigten die NGS-Daten sogar eine 4,38-fache (Log (2)) Expressionssenkung in der AS + Eylea® Gruppe, während die reine angiogene Stimulation im Durchschnitt der biologischen Replikate keinen Einfluss auf diese miRNA zu haben scheint. Eine Übersicht über die Stärke und Richtung des Effekts, sowie über die Streuung zwischen den Gruppen und den biologischen Replikaten der moderat exprimierten miRNAs in den NGS-Daten ist in Abbildung 23 dargestellt.

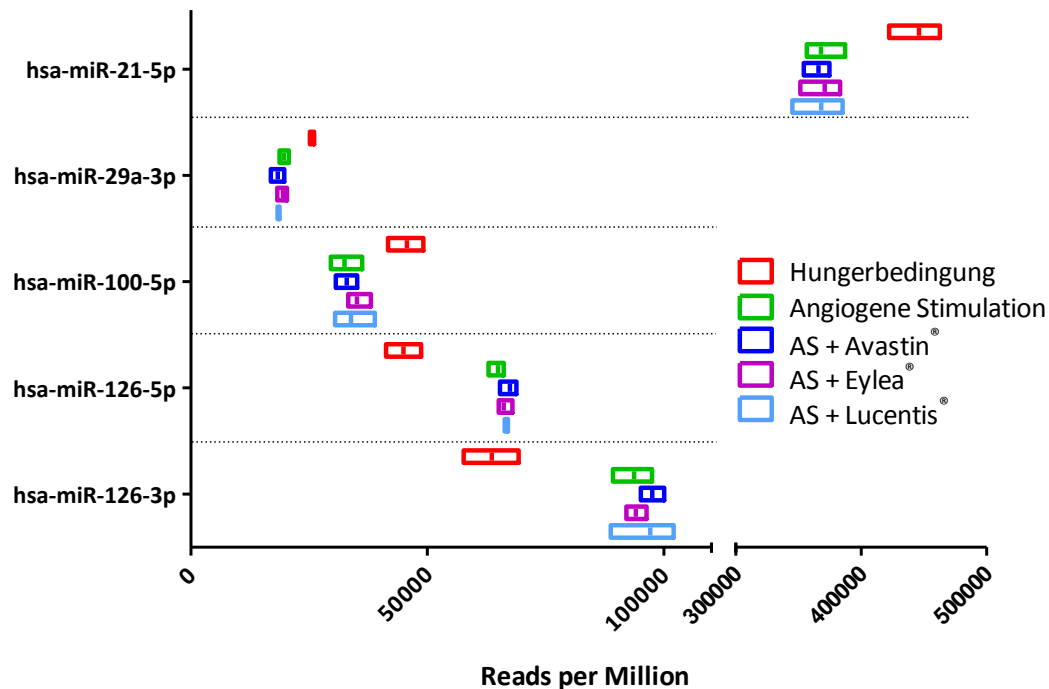


**Abbildung 23:** Änderung der Expression der 10 miRNAs, die in mindestens einer Gruppe im Vergleich zur Gruppe der Hungerbedingung statistisch signifikant und relevant vermehrt oder weniger stark exprimiert wurden. Die Boxplots zeigen den minimalen und maximalen Wert, sowie den Mittelwert der jeweils drei biologischen Replikate an.



*Stark exprimierte miRNAs, die eine statistisch signifikante Veränderung von mind. 15 % zeigten*

Neben den miRNAs, die eine relevante Veränderung zeigten, wurden zusätzlich noch miRNAs genauer betrachtet, die besonders stark (mind. 1 % des miRNoms) exprimiert wurden und signifikante Expressionsänderungen aufwiesen, die jedoch unterhalb des definierten Schwellenwertes lagen. Dabei waren drei miRNAs durch angiogene Stimulation weniger exprimiert als unter Hungerbedingung (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-29a-3p und hsa-miR-100-5p), während zwei miRNAs vermehrt exprimiert waren (hsa-miR-126-5p und hsa-miR-126-3p). Die partielle Hemmung der Stimulation durch die verschiedenen VEGF-Inhibitoren hatte auch bei Betrachtung der stark exprimierten miRNAs nur einen geringen Einfluss auf deren Expression (siehe auch Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Änderung der Expression der fünf miRNAs, die mind. 1 % des miRNoms ausmachten und in einer der Gruppen im Vergleich zur Hungerbedingung signifikant um mind. 15 % vermehrt oder weniger stark exprimiert wurden. Die Boxplots zeigen den minimalen und maximalen Wert, sowie den Mittelwert der drei biologischen Replikate an.

### 3.3.2.2 Reproduzierbarkeit der NGS-Ergebnisse in unabhängigen Versuchen

Die Ergebnisse einer Sequenzierung werden meist in unabhängigen Versuchen mittels qPCR überprüft (206). Dabei muss beachtet werden, dass man mit der qPCR nur Unterschiede, die mindestens 2-fach sind (entsprechend einer Verdoppelung oder Halbierung der Konzentration), sicher detektieren kann. Somit wurden die Ergebnisse der Sequenzierung für die moderat exprimierten, statistisch signifikant

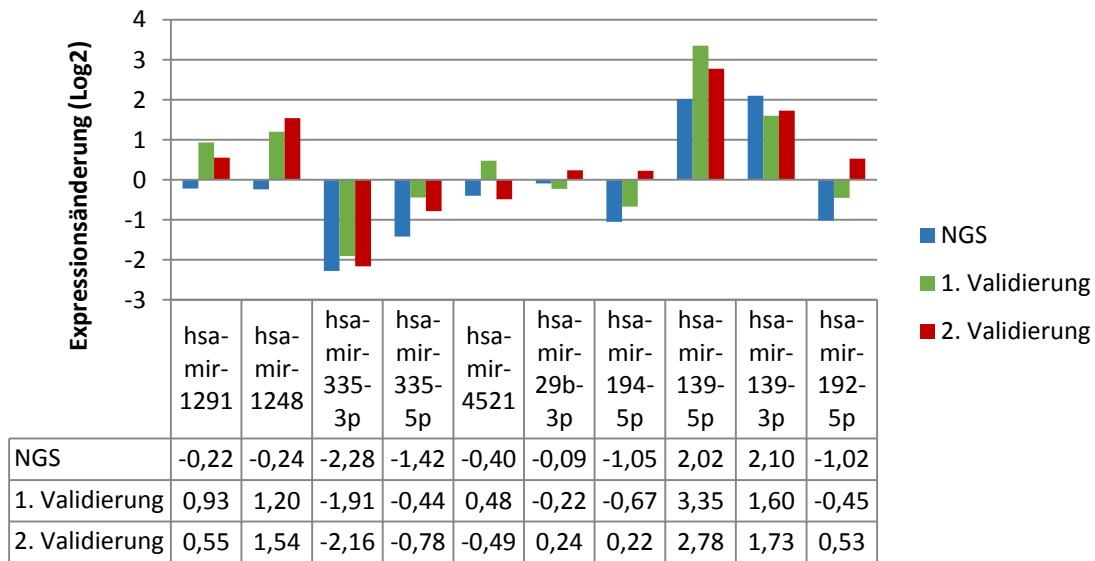
## Präklinische Aspekte

( $p \leq 0,05$  bei Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen, DESeq2) und relevant (mind. 2-fach) veränderten miRNAs in unabhängigen Versuchen mittels qPCR validiert. Bei den stark exprimierten miRNAs betrugen die Expressionsänderungen nur max. 53 %. Um diese niedrigen Unterschiede validieren zu können, wäre z.B. eine digitale PCR notwendig gewesen, welche jedoch nicht zur Verfügung stand.

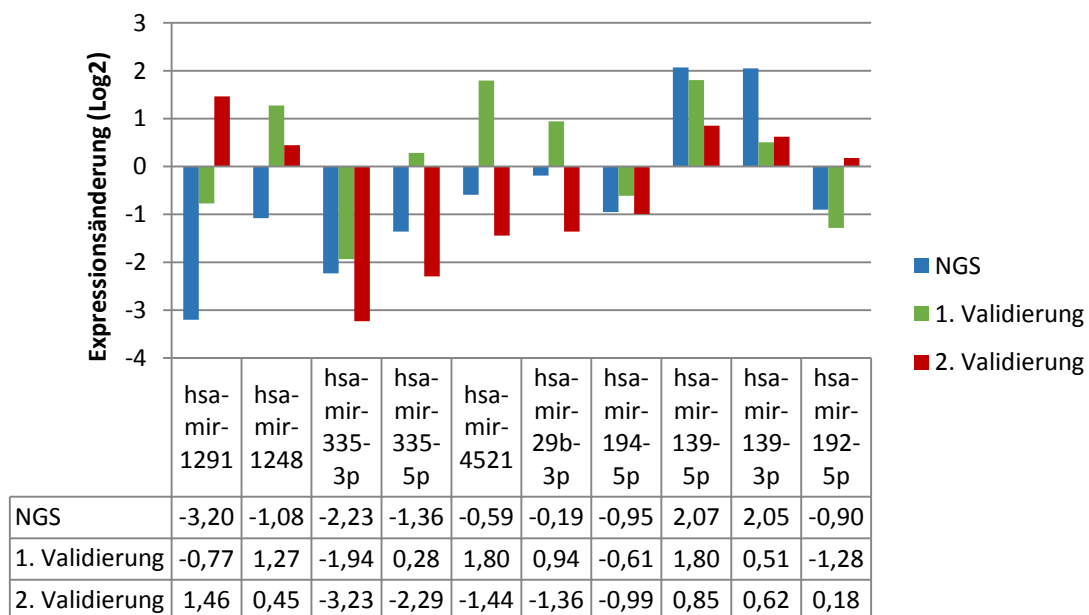
Für die Validierung wurde das Stimulationsexperiment der HRMVECs in zwei unabhängigen Versuchen wiederholt. Um eine Normalisierung der Expression in der qPCR zu ermöglichen, wird eine miRNA Sequenz benötigt, welche durch die Versuchsbedingungen in möglichst geringem Umfang beeinflusst wird. Peltier und Latham zeigten, dass die Verwendung einer miRNA, welche in den eigenen Sequenzierungsdaten als wenig verändert gefunden wurde, zu einem besseren Ergebnis führt, als z.B. die Verwendung von U6 snRNA oder 5s rRNA, welche von vielen Gruppen standardmäßig zur Normalisierung eingesetzt werden (207). In den vorliegenden NGS-Daten konnte als miRNA, deren Expression sich nur minimal zwischen den Gruppen unterschied, hsa-let-7e-5p identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle 31), welche sich somit potentiell als Housekeeping Gen für die qPCR eignete. Die in der qPCR gemessenen c(t) Werte (cycle threshold (Schwellenwert-Zyklus), der Zyklus, ab dem das Fluoreszenzsignal erstmalig über dem Rauschen liegt) für diese miRNA schwankten nur geringfügig zwischen den verschiedenen Gruppen. Somit wurde die hsa-let-7e-5p als geeignetes Housekeeping Gen für die Validierung der NGS-Ergebnisse bestätigt (siehe Anhang Abbildung 57).

Die Ergebnisse der Validierung durch die qPCR für die moderat exprimierten miRNAs sind in Abbildung 25 den NGS-Ergebnissen gegenübergestellt. Für die miRNAs hsa-miR-335-5p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-139-5p sowie hsa-miR-139-3p konnte die Regulationsrichtung der NGS-Ergebnisse mit einer anderen Methode (qPCR) in unabhängigen Versuchen bestätigt werden. Für die anderen acht miRNAs, welche zum Teil in den NGS-Daten relativ geringe Unterschiede zeigten, bzw. deutlich zwischen den biologischen Replikaten schwankten (siehe Abbildung 23), waren die qPCR Ergebnisse nicht eindeutig und konnten somit die NGS-Ergebnisse nicht validieren. Die vier bestätigten miRNAs wurden weitergehend in der *in silico* Analyse, sowie im Tiermodell untersucht. Exemplarisch wurden außerdem HRMVECs mit der miRNA-Mimic für hsa-miR-335-5p transfiziert und im Sphäroid-Angiogenesemodell untersucht.

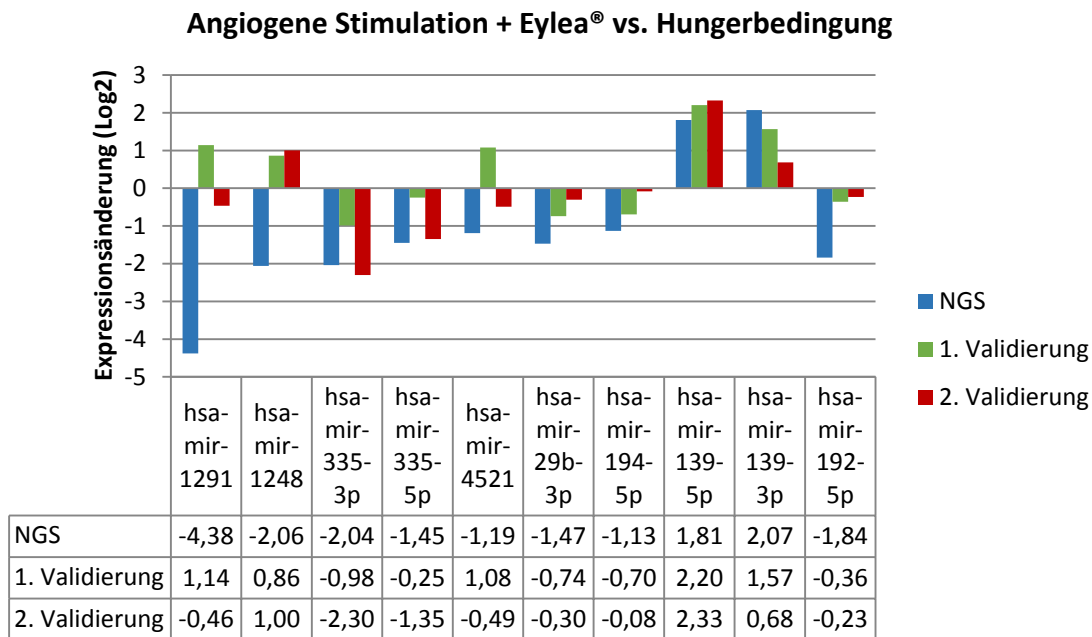
a)

**Angiogene Stimulation vs. Hungerbedingung**

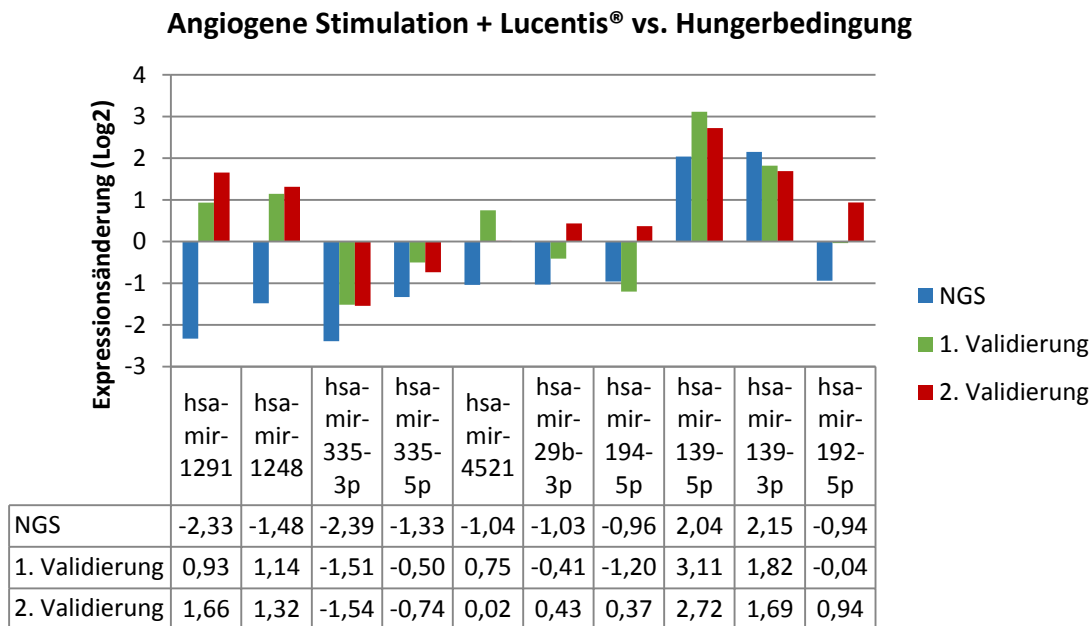
b)

**Angiogene Stimulation + Avastin® vs. Hungerbedingung**

c)



d)

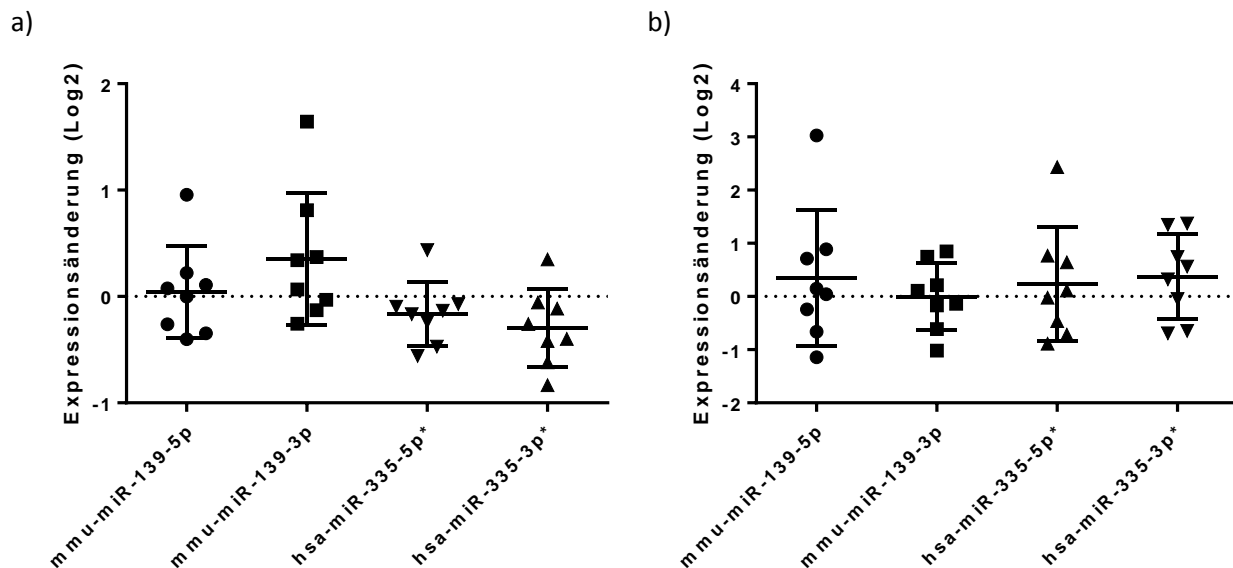


**Abbildung 25:** Vergleich der NGS-Daten mit den qPCR-Ergebnissen zweier unabhängig voneinander durchgeführter Validierungsversuche für die Gruppen angiogene Stimulation (AS) (a), AS + Avastin® (b), AS + Eylea® (c) und AS + Lucentis® (d) jeweils versus Hungerbedingung. Für die miRNAs hsa-miR-335-5p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-139-5p und hsa-miR-139-3p konnte die Richtung der Regulation der NGS-Ergebnisse mittels qPCR bestätigt werden.

### 3.3.2.3 Expression bestimmter miRNAs *in vivo*

In einem weiteren Schritt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die *in vitro* Ergebnisse in das OIR-Mausmodell, ein *in vivo* Angiogenesemodell (113), übertragbar sind.

Beim Vergleich der unbehandelten OIR-Mäuse mit den NOIR-Mäusen sah man, dass die vier mittels qPCR für die HRMVECs als verändert bestätigten miRNAs im OIR-Modell, abgesehen von wenigen Ausreißern (maximale Expressionsänderung: 1,6-fach, siehe auch Abbildung 26a), relativ stabil exprimiert wurden. Auch eine Injektion von Aflibercept im Vergleich zu DPBS änderte die Expression dieser vier miRNAs bis auf wenige Ausreißer kaum (siehe Abbildung 26b).

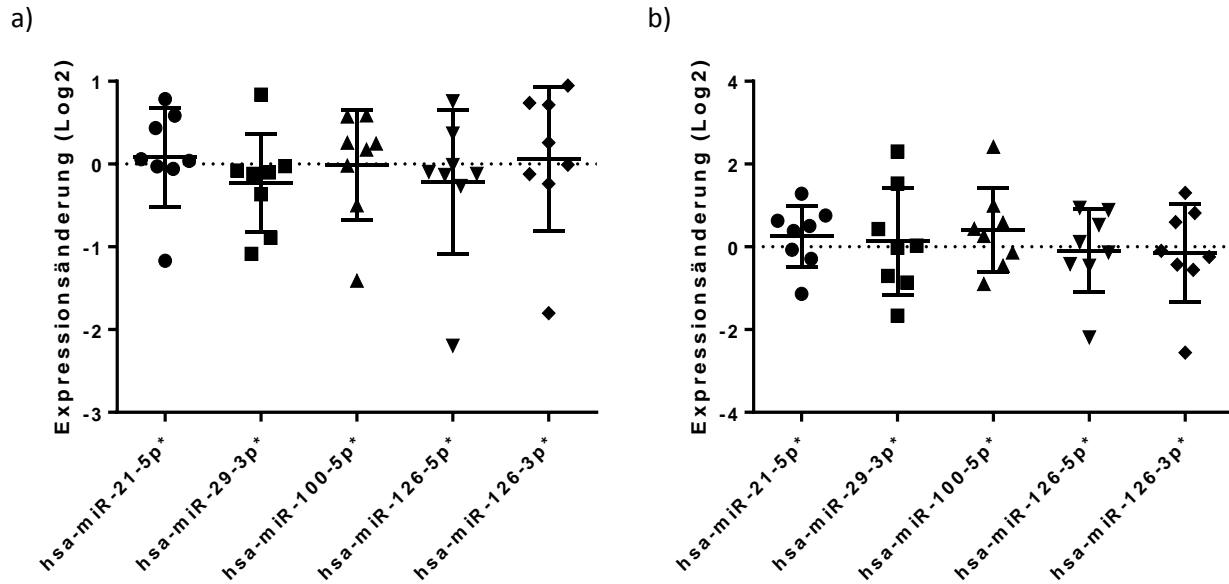


**Abbildung 26:** Vergleich der Expression der *in vitro* zwischen der angiogenen Stimulation und der Hungerbedingung veränderten miRNAs (bestätigt mittels qPCR), zwischen a) OIR- und NOIR- Mäusen und b) Injektion von Eylea® vs. DPBS in OIR-Mäusen. Die einzelnen Symbole stehen in Teil a) der Abbildung für die Expression der jeweiligen miRNA in einer Retina in jeweils einer Maus (die beiden Augen wurden getrennt betrachtet) im Vergleich zum Mittelwert des parallelen NOIR-Wurfs. In Teil b) der Abbildung wurde intraindividuell der Vergleich Injektion von Eylea® vs. DPBS aufgetragen. In keinem der Vergleiche war eine der miRNAs statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert ( $\Delta\Delta C_t$ -Methode, p-Wert  $>0,05$ ).

\*Die Sequenz der humanen und murinen miRNAs unterscheidet sich nicht, weshalb die humanen Primer auch im OIR-Modell verwendet wurden.

Die miRNAs, die in den Zellkulturversuchen sehr stark exprimiert waren, deren Expressionsänderungen jedoch unterhalb des Schwellenwertes lagen, waren auch in den Mausretinae relativ stark exprimiert (die c(t)-Werte betrugen im Mittel der OIR- und NOIR-Tiere für die miR-21-5p: 21,1; für die miR-29a-3p: 23,8; für die miR-100-5p: 26,0; für die miR-126-5p: 23,2; für die miR-126-3p: 25,0) und waren bis auf wenige Ausreißer kaum zwischen OIR und NOIR verändert. Die maximale Änderung betrug -2,2-fach (Log2) für die miR-126-5p zwischen OIR und NOIR, wobei es sich dabei um einen deutlichen Ausreißer

handelte. Die restlichen Werte zeigten nur eine geringe Veränderung zwischen OIR und NOIR (siehe auch Abbildung 27a). Auch eine Injektion von Eylea® im Vergleich zu einer Injektion von DPBS bei OIR-Tieren beeinflusste die Expression dieser miRNAs nur geringfügig (siehe Abbildung 27b).



**Abbildung 27:** Vergleich der Expression der miRNAs, die *in vitro* besonders stark exprimiert waren, im OIR-Modell zwischen a) OIR- und NOIR-Mäusen und b) Injektion von Eylea® vs. Injektion von DPBS in OIR-Mäusen. Die einzelnen Symbole stehen in Teil a) der Abbildung für die Expression der jeweiligen miRNA in einer Retina in jeweils einer Maus (die beiden Augen wurden getrennt betrachtet) im Vergleich zum Mittelwert des parallelen NOIR-Wurfs. In Teil b) der Abbildung wurde intraindividuell der Vergleich Injektion Eylea® vs. Injektion DPBS gezogen und aufgetragen. In keinem der Vergleiche war eine der miRNAs statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, p-Wert  $>0,05$ ).

\*Die Sequenz der humanen und murinen miRNAs unterscheidet sich nicht, weshalb die humanen Primer auch im OIR-Modell verwendet wurden.

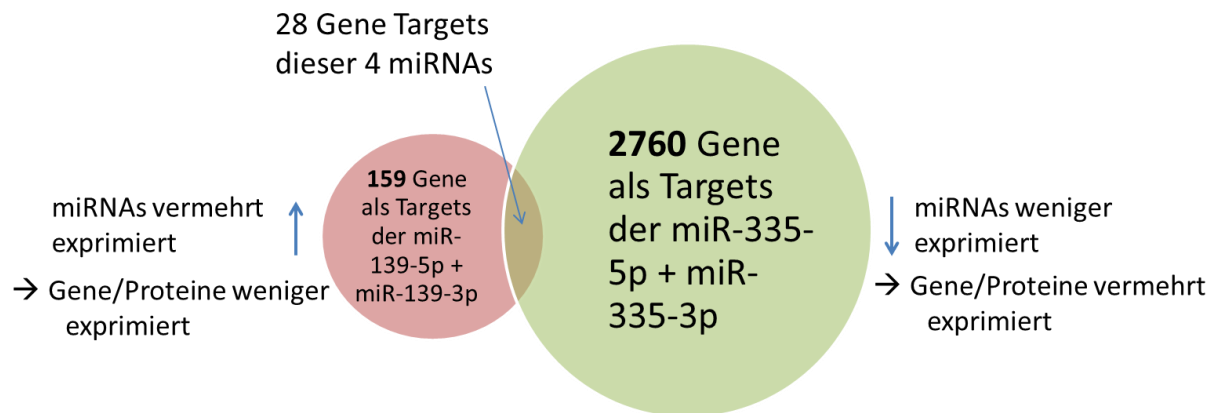
Insgesamt war die Streuung der Werte für alle betrachteten miRNAs doch relativ groß. Es gab keine signifikanten Expressionsunterschiede der betrachteten miRNAs zwischen den OIR- und den NOIR-Tieren und auch die intravitreale Injektion von Eylea® vs. DPBS in OIR Tieren resultierte nicht in einer Beeinflussung der betrachteten miRNAs in der Gesamtretna.

### 3.3.2.4 *In silico* Target Analyse ausgewählter miRNAs

#### Relevant veränderte miRNAs

Die vier miRNAs miR-139-5p, miR-139-3p, miR-335-5p und miR-335-3p waren in den NGS-Daten der *in vitro* Versuche als signifikant und relevant verändert gefunden worden und konnten mittels qPCR in unabhängigen Versuchen bestätigt werden.

In der *in silico* Analyse wurden jeweils die beiden gleichgerichteten miRNAs gemeinsam betrachtet. Das Online-Tool miRWalk2.0 lieferte für miR-139-5p und miR-139-3p (beide im Vergleich zur Hungerbedingung vermehrt exprimiert) 159 validierte Gene als Ziele dieser beiden miRNAs. Für miR-335-5p und miR-335-3p (beide weniger exprimiert im Vergleich zur Hungerbedingung) konnten 2760 Zielgene identifiziert werden. 28 Gene sind gemeinsame Zielstrukturen dieser vier miRNAs (siehe hierzu auch Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Die Online-Applikation miRWalk lieferte 159 Zielgene für miR-139-5p und miR-139-3p, sowie 2760 Zielgene für miR-335-5p und miR-335-3p. 28 Gene sind gemeinsame Zielstrukturen dieser vier miRNAs. Die Größe der Kreise ist nicht maßstabsgetreu, sondern nur symbolisch zu sehen.

Bei einer Gene Ontology (GO) Enrichment Analyse (<http://geneontology.org/>) werden die vorgegebenen Gene z.B. biologischen Prozessen zugeordnet und mit der Häufigkeit, mit der diese Prozesse im Referenzdatensatz (in diesem Fall in den Proteinen des Menschen) vorkommen, verglichen. Für die Targets der miR-335-5p und miR-335-3p (exklusive der gemeinsamen Targets mit miR-139-5p und miR-139-3p) waren unter anderem Prozesse wie Angiogenese, Regulation von Angiogenese und Zellmigration unter den zehn biologischen Prozessen, in denen diese Targets am häufigsten vorkamen. Eine Übersicht über diese zehn Prozesse sowie die Werte des „Fold Enrichments“ ist in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14:** Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-335-5p und miR-335-3p

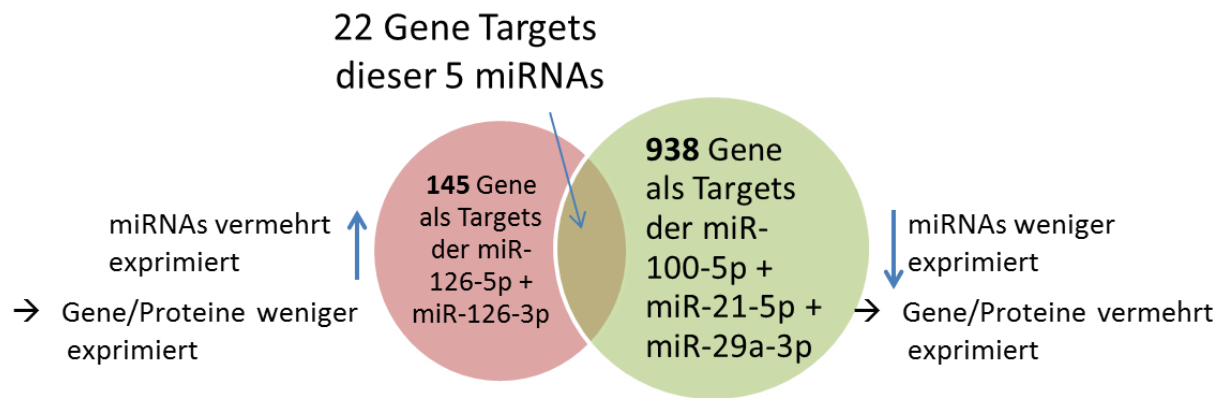
Gene Ontology Oberbegriffe	Fold Enrichment
Cholesterol metabolic process	2,46
Vascular process in circulatory system	2,10
Regulation of ossification	2,06
Regulation of angiogenesis	1,93
Regulation of blood circulation	1,86
Positive regulation of cell migration	1,81
Blood circulation	1,80
Angiogenesis	1,79
Chemotaxis	1,77
Reproductive structure development	1,75

Bei der GO Enrichment Analyse für die Zielgene von miR-139-5p und miR-139-3p (exklusive der gemeinsamen Targets mit miR-335-5p und miR-335-3p) konnten keine biologischen Prozesse gefunden werden, in denen diese Targets vermehrt vorkommen. Dasselbe galt für die 28 Zielgene, die die vier miRNAs als gemeinsame Zielgene aufweisen.

### *Stark exprimierte miRNAs, die eine signifikante Veränderung zeigten*

Die miRNAs, die laut NGS-Daten besonders stark exprimiert waren (mind. 1 % des miRNoms) und um mind. 15 % verändert waren, wurden ebenfalls mittels GO Enrichment Analyse untersucht. Auch hierbei erfolgte zuerst die Targetidentifizierung mittels miRWalk. Die miRNAs miR-21-5p, miR-29a-3p und miR-100-5p waren im Vergleich zur Hungerbedingung durch angiogene Stimulation weniger exprimiert. Für diese drei miRNAs wurden 938 Zielgene gefunden. Die miRNAs miR-126-5p und miR-126-3p waren im Vergleich zur Hungerbedingung vermehrt exprimiert und lieferten 145 validierte Targetgene. 22 Gene sind gemeinsame Targets dieser fünf miRNAs (siehe hierzu auch Abbildung 29).





**Abbildung 29:** Die Online-Applikation miRWalk lieferte 145 Zielgene für die miR-126-5p und miR-126-3p sowie 938 Zielgene für die miR-21-5p, miR-29a-3p und miR-100-5p. 22 Gene sind gemeinsame Zielstrukturen dieser fünf miRNAs. Die Größe der Kreise ist nicht maßstabsgetreu, sondern nur symbolisch zu sehen.

Für die Targets von miR-100-5p, miR-21-5p und miR-29a-3p stand der GO Begriff, der das höchste Fold Enrichment zeigte, im Zusammenhang mit der negativen Regulation von extrinsischen Apoptosesignalen. Da die drei miRNAs unter angiogener Stimulation weniger exprimiert waren, als unter Hungerbedingung, könnte dies für eine verstärkte Hemmung von Apoptosesignalen unter angiogener Stimulation sprechen. Alle weiteren der ersten zehn biologischen Prozesse waren keine Prozesse, die im direkten Zusammenhang stehen mit Angiogenese oder Endothelzellen (siehe auch Tabelle 15). Etwas weniger stark angereichert waren unter anderem Prozesse wie Regulation der ERK1- und ERK2-Signalkaskaden (2,74), Antwort auf Sauerstoff (2,64), Organisation der Extrazellulärmatrix (2,62), positive Regulation der Zellmigration (2,37) und Zellproliferation (2,1), welche im Zusammenhang mit Endothelzellen und Reaktion auf angiogene Stimuli stehen könnten.

## Präklinische Aspekte

**Tabelle 15:** Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-21-5p, miR-29a-3p und miR-100-5p

Gene Ontology Oberbegriffe	Fold Enrichment
Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	7,15
Regulation of sodium ion transmembrane transport	5,20
Positive regulation of neuron death	4,91
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	4,89
Regulation of phospholipase activity	4,76
Cellular response to mechanical stimulus	4,42
Nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	4,27
Translational initiation	4,16
Regulation of smooth muscle cell proliferation	4,07
Viral transcription	4,04

Für die Targets von miR-126-5p und miR-126-3p, welche unter angiogenen Bedingungen vermehrt exprimiert waren, waren unter anderem Prozesse wie Regulation der Kinaseaktivität, intrazelluläre Signalweiterleitung, Zelloberflächenrezeptor Signalweitergabe und Zelldifferenzierung unter den zehn biologischen Prozessen, in denen die Targets am häufigsten vorkamen und somit durch die vermehrte Expression der miRNAs gedämpft sein müssten. Eine Übersicht, über diese zehn Prozesse sowie die Werte des „Fold Enrichments“ ist in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16:** Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-126-5p und miR-126-3p

Gene Ontology Oberbegriffe	Fold Enrichment
Regulation of kinase activity	3,62
Response to organic cyclic compound	3,57
Response to lipid	3,41
Response to oxygen-containing compound	2,85
Intracellular signal transduction	2,72
Cellular response to organic substance	2,6
Cell surface receptor signaling pathway	2,48
Animal organ development	2,23
Regulation of transcription, DNA-templated	2,21
Cell differentiation	2,11

Die 22 Targets aller fünf sehr stark exprimierten miRNAs kommen besonders häufig in biologischen Prozessen wie der positiven Regulation von Zelldifferenzierung vor. Dass sowohl miRNAs, die unter angiogenen Bedingungen vermehrt exprimiert werden, als auch miRNAs, die weniger häufig vorkommen,

diese Proteine als Target haben, spricht für eine sehr feine Regulierung dieser Prozesse. Eine Übersicht über die drei biologischen Prozesse ist in Tabelle 17 zusammengefasst.

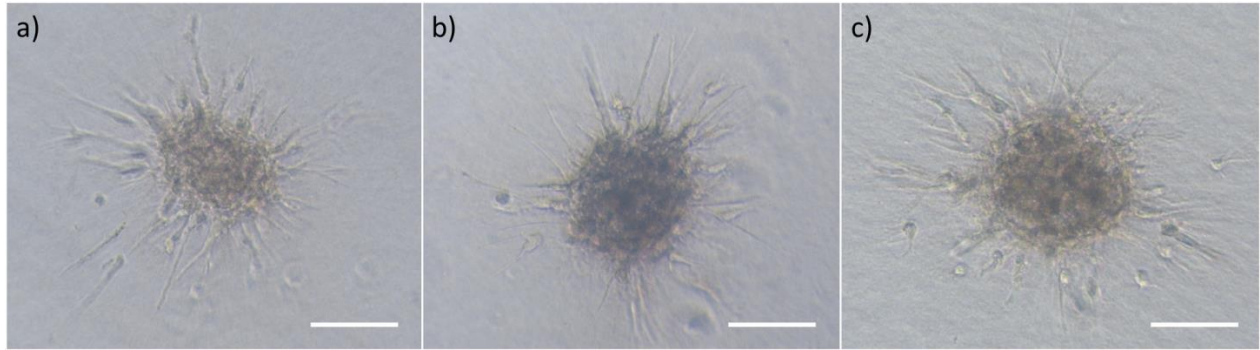
**Tabelle 17:** Die GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der gemeinsamen Targets von miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-126-5p und miR-126-3p

Gene Ontology Oberbegriffe	Fold Enrichment
Positive regulation of cell differentiation	8,35
Transcription, DNA-templated	4,98
Regulation of transcription, DNA-templated	3,55

### 3.3.2.5 Untersuchung des Effekts einer Transfektion von HRMVECs mit miR-335-5p im Sphäroid-Angiogenesemodell

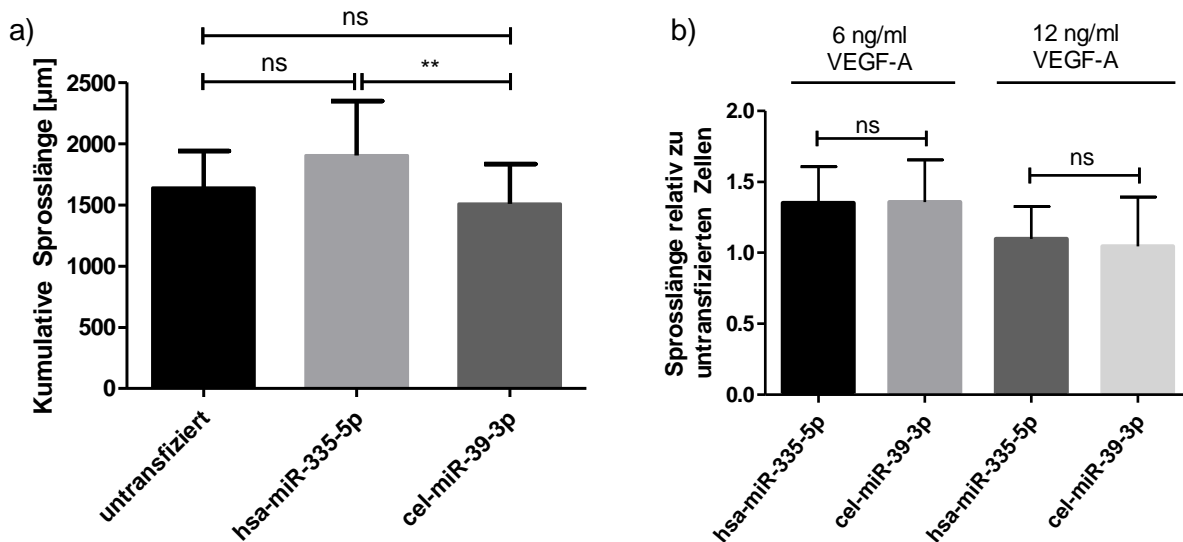
Im letzten Schritt sollte eine der miRNAs, die in den *in vitro* Versuchen zwischen den Gruppen verändert gefunden und für die dies auch in unabhängigen Versuchen bestätigt wurde, auf ihre Funktionalität hin untersucht werden. Es wurde miR-335-5p ausgewählt, da die *in silico* Analyse zeigte (siehe auch Abschnitt 3.3.2.4), dass diese miRNA (zusammen mit miR-335-3p) möglicherweise verschiedene Prozesse im Zusammenhang mit Angiogenese beeinflusst. Da die miR-335-5p unter angiogener Stimulation im Vergleich zur Hungerbedingung weniger exprimiert wurde, sollte die Reaktion auf rekombinantes VEGF-A nach einer Transfektion von HRMVECs mit der „microRNA-Mimic für hsa-miR-335-5p“ untersucht werden.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch mit VEGF-A stimulierte Sphäroide aus untransfizierten HRMVECs (a), aus HRMVECs, die mit der microRNA-Mimic für hsa-miR-335-5p transfiziert wurden (b) und aus Zellen, die mit der Kontroll-miRNA (cel-miR-39-3p) transfiziert wurden (c). Hierbei sieht man, dass sowohl Sphäroide aus untransfizierten HRMVECs, als auch aus transfizierten HRMVECs auf den angiogenen Stimulus durch VEGF-A mit radialer Sprossung reagieren.



**Abbildung 30:** Exemplarische HRMVEC-Sphäroide bestehend aus a) untransfizierten Zellen, b) aus mit der microRNA-Mimic für hsa-miR-335-5p transfizierten Zellen und c) aus mit der microRNA-Mimic für die Kontrolle (cel-miR-39-3p) transfizierten Zellen. (Der weiße Balken entspricht einer Länge von 100 µm)

In einem ersten Versuch wurden die Sphäroide mit 25 ng/ml VEGF-A stimuliert (siehe Abbildung 31a). Die dabei resultierende Sprosslänge war in allen Gruppen sehr stark, es war jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden transfizierten Gruppen zu sehen. Es wurde davon ausgegangen, dass ein möglicherweise kleiner Effekt der Transfektion mit der miRNA unter diesen Bedingungen nicht sichtbar wäre, weshalb in allen weiteren Versuchen (kombiniert in b) die VEGF-A-Konzentration deutlich verringert wurde (Einsatz von 6 ng/ml und 12 ng/ml). Dabei konnte der Unterschied zwischen den zwei Arten transfizierter Zellen, nicht bestätigt werden, denn weder unter Stimulation mit 6 ng/ml noch mit 12 ng/ml VEGF-A gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Transfektionsarten. Bei Stimulation mit 6 ng/ml VEGF-A zeigten die Sphäroide mit beiden Arten transfizierter Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen ein etwas gesteigertes Sprossen (ca. 1,35-fache Sprosslänge), was jedoch eher für einen Einfluss der Transfektion sprechen würde, als für einen Einfluss der miR-335-5p. Unter Stimulation mit 12 ng/ml war dagegen kein vermehrtes Sprossen im Vergleich zu untransfizierten Zellen erkennbar.



**Abbildung 31:** Quantitative Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Sprosslänge von HRMVEC-Sphäroiden. a) Einzelversuch zur Stimulation der Sphäroide mit 25 ng/ml VEGF-A resultierte in keinem signifikanten Unterschied zwischen der kumulativen Sprosslänge der untransfizierten Zellen und der mit miR-335-5p transfizierten Zellen, sowie zwischen den untransfizierten Zellen und der Kontrolltransfektion. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied (One-way ANOVA,  $p < 0,01$ ) zwischen der miR-335-5p und der Kontrolltransfektion. Dieser Unterschied konnte in den weiteren Versuchen mit geringerer Konzentration von VEGF-A (6 ng/ml bzw. 12 ng/ml) jedoch nicht bestätigt werden (b). In beiden Konzentrationen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Transfektion mit hsa-miR-335-5p und cel-miR-39-3p (jeweils ein t-Test: für 6 ng/ml VEGF-A  $p = 0,9087$ ; für 12 ng/ml VEGF-A  $p = 0,6131$ ; aufgrund der Kombination mehrerer Versuche ist die Sprosslänge relativ zu untransfizierten Zellen dargestellt).

### 3.4 Diskussion – präklinischer Teil

#### 3.4.1 *In vitro* Modell für das neuro-vaskuläre Interface und Beeinflussung durch VEGF-Inhibition

Es ist bekannt, dass sich Neurone und Gefäße in ihrem Wachstum und auch in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen (144, 145). Sowohl in der klinischen Praxis, als auch in Tiermodellen wurde diese Interaktion beobachtet und es gibt bereits erste Ansätze, hier therapeutisch einzugreifen (154).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Zellkultur isolierter primärer retinaler Zellen in der Lage ist, Endothelzellsphäroide zum Sprossen anzuregen und ob damit der Aspekt der durch neuronale Stimulation induzierten Angiogenese (35), wie er z.B. bei der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie vorkommt, in einem *in vitro* Modell abgebildet werden kann. Ein Modell für die neuro-vaskuläre Interaktion sollte, wie der Namen vorgibt, sowohl eine neuronale, als auch eine vaskuläre Komponente beinhalten. Die in der Literatur beschriebenen *in vivo* Angiogenese-Modelle (51, 113) bilden natürlich aufgrund der *in vivo* Situation neben den eigentlich betrachteten Proliferationen oder

## Präklinische Aspekte

Neovaskularisationen auch die neuro-vaskuläre Interaktion mit ab, allerdings kann hier eine Beeinflussung durch andere systemische Komponenten nicht ausgeschlossen werden. Will man einzelne Aspekte der neuro-vaskulären Interaktion isoliert betrachten, ist dies nur *in vitro* möglich. In den häufig verwendeten *in vitro* Angiogenese-Modellen, ist zwar die vaskuläre Komponente zum Teil recht gut abgebildet, jedoch fehlt hier der neuronale Aspekt, während bei den häufig eingesetzten Retina-Explantaten die Interaktion mit Gefäßen fehlt.

Da bisher kein *in vitro* Modell für die neuro-vaskuläre Interaktion beschrieben war, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ebensolches Modell entwickelt. Hierfür wurden verschiedene Zellarten, die getrennt voneinander bereits in *in vitro* Modellen eingesetzt werden, kombiniert und gemeinsam kultiviert. Durch diese Co-Kultivierung kann die tatsächliche *in vivo* Situation möglicherweise besser abgebildet werden, als bei einer separaten Betrachtung. Es ist bekannt, dass sich Endothelzellsphäroide von anderen Zellarten, wie z.B. Osteoblasten (208) oder Perizyten (209) in ihrem Sprossverhalten sowohl positiv, als auch negativ beeinflussen lassen, weshalb der Gedanke aufkam, ob dies auch durch isolierte primäre neuronale Zellen der Fall ist. Das Endothelzell-Sphäroidmodell ist bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen ausführlich beschrieben worden: so konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Aussprossungen tatsächlich ein Lumen aufweisen und die Sphäroide höchst sensibel auf die Anwesenheit von VEGF-A und bFGF durch Ausbildung dieser Sprossungen reagieren (116). Sie kommen also einem ruhenden Endothel, das durch Wachstumsfaktoren zum Sprossen angeregt wird, sehr nahe.

Für retinale neuronale Zellkulturen gibt es verschiedene Varianten (155): zum einen wäre ein retinales Explantat möglich, allerdings ist hier sehr viel Material nötig, um den Boden von Well-Platten vollständig zu bedecken und damit gleichmäßige Bedingungen zu schaffen. Eine andere Möglichkeit ist ein enzymatischer Verdau des Gewebes und Ausplattieren der isolierten Zellen in einem Monolayer, wobei die Zellen, da sie nicht proliferieren dabei keine konfluente Zellkultur erzeugen. Bei dieser Variante kann aber davon ausgegangen werden, dass die Zellen relativ gleichmäßig im Well verteilt sind und somit eine Beeinflussung der später darüber geschichteten Sphäroide ebenfalls gleichmäßig erfolgen sollte. Dementsprechend konnten bei den Versuchen keine regionalen Unterschiede in der Stimulation der Endothelzellsphäroide erkannt werden. Der Monolayer von dissoziierten Zellen führt aber auch dazu, dass der Zell-Zellverband aufgelöst wurde und es somit sein kann, dass verschiedene Reparaturmechanismen angestoßen wurden, bzw. andere Oberflächenmarker, oder auch Zytokine exprimiert werden als im natürlichen Umfeld (157, 158), was das Modell möglicherweise beeinflussen kann. Die primären neuronalen Zellen zeigen ein paar Tage nach der enzymatischen Dissoziation unter

Kulturbedingungen wieder Wachstum von Axonen und Dendriten ((156), sowie eigene nicht gezeigte Daten), was für ihre Agilität in der Zellkultur spricht und auch einen Hinweis auf ein Verhalten ähnlich zur *in vivo* Situation geben könnte.

#### **3.4.1.1 Beeinflussung sphäroidaler Sprossung durch ko-kultivierte primäre retinale Zellen**

Retinale Ganglienzellen sind *in vivo* an der Ausbildung der Gefäßplexi in der Netzhaut beteiligt. Dies zeigt ein Mausmodell, in dem bei Fehlen von retinalen Ganglienzellen auch keine Gefäße in die Netzhaut einwachsen (146). So wurde in den ersten Schritten untersucht, ob die primären retinalen Zellen in der *in vitro* Situation einen angiogenen Effekt auf die Endothelzellsphäroide aufweisen. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein der neuronalen Mischkultur unterhalb der Endothelzellsphäroide eine statistisch signifikante Sprossung der Sphäroide induzierte, wobei eine steigende Anzahl an neuronalen Zellen auch zu einer vermehrten Sprossung führte. Dies galt bis zu einer Konzentration von 120.000 Zellen/Well, während eine weitere Steigerung der Anzahl keine zusätzliche Sprossung mehr induzierte. Diese Art der Dose-Response unterstreicht die Funktionalität des Modells und gibt einen Hinweis darauf, dass es sich nicht um einen zufälligen Effekt handelt. Im Unterschied zur Zugabe von externem rekombinantem VEGF-A war die Stimulation durch die neuronalen Zellen jedoch deutlich geringer (siehe Abschnitt 3.3.1.1 und (117)). Während rekombinantes VEGF-A zu einer extrem starken Sprossung führte (siehe Abbildung 17b), resultierte der Stimulus durch die neuronalen Zellen in der Ausbildung einzelner langer Aussprossungen (vgl. Abbildung 17d). Retinale Ganglienzellen und Photorezeptoren sind *in vivo* als Quellen für VEGF-A bekannt (144-146) und könnten somit auch in der Co-Kultur durch Abgabe des Wachstumsfaktors in das Medium zur angiogenen Stimulation beitragen. Bei der physiologischen Entwicklung des retinalen Gefäßnetzes läuft die Induktion des Gefäßwachstums exakt koordiniert ab und resultiert nicht im Übersprießen von Gefäßen (siehe auch Abschnitt 1.1.4), was entweder an einer nur geringen VEGF-A-Ausschüttung liegt oder durch Hemmmechanismen wie z.B. dem Notch-Signalweg reguliert wird (121). Die extern zugegebene VEGF-A-Konzentration ist mit 25 ng/ml unphysiologisch hoch und spiegelt eher den Status einer proliferativen Retina wider, wie sie z.B. bei der Frühgeborenen-retinopathie vorliegt, während die deutlich geringere Induktion durch die neuronalen Zellen möglicherweise eher dem physiologischen Gefäßwachstum entspricht. Es ist vorstellbar, dass man die Stimulation, die von den neuronalen Zellen ausging, noch weiter hätte steigern können, indem die neuronalen Zellen in ihrer Kultur Hungerbedingung oder Hypoxie ausgesetzt worden wären, um die „physiologische Hypoxie“ zu imitieren (35, 210), bevor sie mit Endothelzellsphäroiden überschichtet wurden.

Die Stimulation durch rekombinantes VEGF-A wurde durch die Anwesenheit der neuronalen Zellen nur wenig beeinflusst. So war zwar in einzelnen Versuchen eine leichte Tendenz zu geringerer Sprossung bei Überschichtung neuronaler Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen, allerdings war dieser Unterschied bei der Gesamtauswertung nicht mehr erkennbar und auch nicht statistisch signifikant. Es ist außerdem bekannt, dass VEGF-A ein Faktor ist, der zum Überleben retinaler neuronaler Zellen beiträgt (211), ein Effekt durch die neuronalen Zellen auf die Stimulation durch VEGF-A war somit nicht zu erwarten.

### 3.4.1.2 Einfluss von VEGF-Inhibition auf die durch neuronale Zellen induzierte Sprossung

In einem weiteren Schritt wurde in dem verwendeten *in vitro* Modell untersucht, ob die durch neuronale Zellen induzierte Sprossung durch einen geeigneten VEGF-Inhibitor gehemmt werden kann. Da davon ausgegangen wird, dass die murinen retinalen Zellen, falls sie VEGF-A produzieren, die murine Form erzeugen, wurde Aflibercept verwendet, welches als einziger VEGF-Inhibitor neben humanem VEGF-A auch die murine Form bindet (191, 192). Eine Zugabe von 7,5 µl Aflibercept pro 100 µl Medium, was der Konzentration entspricht, die im Glaskörper eines Erwachsenen nach intravitrealer Aflibercept Injektion vorliegt (das Glaskörpervolumen eines Erwachsenen beträgt in etwa 4,5 ml (212)), hemmte die induzierte Sprossung deutlich, jedoch nicht vollständig. Es kann jedoch von einer kompletten Bindung des VEGFs ausgegangen werden, denn die Zugabe von 25 ng/ml VEGF-A führt zu übermäßiger Sprossung, welche durch dieselbe Menge Aflibercept vollständig auf Basalniveau gehemmt werden kann (eigene Daten, hier nicht gezeigt).

Dies spricht dafür, dass neben VEGF-A noch weitere angiogene Faktoren von den neuronalen Zellen ins Medium abgegeben werden oder eine direkte Induktion aufgrund der zellulären Nähe entsteht, was z.B. für die Interaktion zwischen Osteoblasten und Endothelzellsphäroiden beschrieben ist (213). Mögliche bisher bekannte Beispiele angiogener Faktoren, die von neuronalen Zellen abgegeben werden, sind PDGF-C (214), Wnt (215) sowie Cadherine (216).

Das in dieser Arbeit etablierte Modell könnte auch dafür geeignet sein, weitere Substanzen, die am neuro-vaskulären Interface eingreifen sollen, in einem *in vitro* Modell zu testen. Allerdings müssen hierfür noch weitergehende Untersuchungen erfolgen, um das Modell genauer zu charakterisieren. So muss die Agilität der neuronalen Zellen nach Überschichtung durch das Gel und auch die Art der Interaktion zwischen den neuronalen Zellen und den Endothelzellsphäroiden genauer untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre eine genaue Charakterisierung der Zusammensetzung des durch die



neuronalen Zellen konditionierten Mediums einschließlich Konzentrationsbestimmung von VEGF und anderen Wachstumsfaktoren, sowie die Durchführung von Sphäroidassays mit diesem Überstand. In einem Ratten-Modell für Diabetische Retinopathie wurde gezeigt, dass VEGF-Hemmung zu einer gesteigerten Apoptose von retinalen Ganglionzellen führt (217). Ein weiterer Aspekt, der in Zukunft noch betrachtet werden sollte, wäre somit der Einfluss der VEGF-Inhibition auf die isolierten neuronalen Zellen selbst.

Einige Versuche mussten aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da die Positivprobe ohne erkennbaren Grund versagte. Auch diesem Phänomen muss bei der weiteren Etablierung des Modells in jedem Fall nachgegangen werden.

Eine Einschränkung des Modells ist sicherlich die Verwendung von murinen primären retinalen Zellen in Kombination mit humanen umbilikalvenösen Endothelzellen. Da die Homologie zwischen Maus und Mensch jedoch relativ hoch ist (ca. 90 % (218)), wurde die Limitation, die die Verwendung zweier Spezies mit sich bringt, aufgrund der Verfügbarkeit der eingesetzten Zellen in Kauf genommen. Denn humane retinale primäre Zellen sind nur äußerst selten verfügbar, sodass eine Verwendung im Rahmen eines Modells als nicht machbar eingestuft wurde, während murine retinale Zellen relativ gut verfügbar sind und auch für andere *in vitro* Untersuchungen eingesetzt werden (156). Sphäroide lassen sich prinzipiell aus verschiedenen Zellarten formen (siehe auch Abschnitt 3.2.3.8), allerdings wird der Sproutingassay meist mit HUVECs (219, 220) durchgeführt. Endothelzellen aus der Maus sind weniger leicht verfügbar und deutlich schlechter charakterisiert als HUVECs.

Abschließend lässt sich also sagen, dass mit dem in dieser Arbeit etablierten Modell die *in vivo* gesehene neuro-vaskuläre Interaktion *in vitro* abgebildet werden konnte und die Zugabe von Aflibercept diese Interaktion beeinflusste, jedoch offenbar auch eine VEGF (und PlGF) unabhängige Interaktion vorherrscht, die durch Aflibercept nicht beeinträchtigt wurde.

### **3.4.2 Einfluss von VEGF und VEGF-Inhibition auf das miRNA Expressionsprofil in humanen retinalen mikrovaskulären Endothelzellen**

Auf die Steuerung und Stabilisierung der Proteinexpression haben miRNAs weitreichenden Einfluss, der in zahlreichen Zelltypen und Funktionszuständen von Geweben jedoch nur unzureichend charakterisiert ist. MiRNA Expressionsmuster in Körperflüssigkeiten werden als Tumormarker propagiert (221, 222) und auch therapeutische Ansätze der Modulation von miRNA Signalen werden verfolgt (223, 224). Metin *et al.* haben erst kürzlich das miRNA Spektrum im Plasma von Kinder mit einer Stadium 3+ ROP untersucht

und dieses mit Kontrollkindern verglichen (225) und miRNAs als potentielle therapeutische Targets bei Kindern mit ROP beschrieben. Vor diesem Hintergrund galt es, mögliche Einflüsse von VEGF und VEGF-Inhibitoren auf das miRNom humaner retinaler Endothelzellen, die unter anderem an der Entstehung der Frühgeborenenretinopathie beteiligt sind, zu untersuchen.

Hierbei zeigte sich, dass das miRNom von HRMVECs ein erstaunlich robustes und stabiles Verteilungsmuster der miRNA aufweist. Insgesamt wurden in jeder Probe ca. 800 unterschiedliche miRNA Formen nachgewiesen. Dabei standen quantitativ wenige miRNAs im Vordergrund. Eine einzelne miRNA (miR-21-5p) machte bis zu 45 % des gesamten miRNoms der Zellen aus, während weitere 14 miRNAs jeweils mind. 1 % des miRNoms ausmachten. Die relative Häufigkeit aller anderen miRNAs lag deutlich darunter. Der größte Unterschied im miRNA Expressionsprofil bestand zwischen den Gruppen der Hungerbedingung und der angiogenen Stimulation. Eine Hemmung von VEGF durch Zugabe unterschiedlicher VEGF-Inhibitoren für 12 h nach vorausgegangener 12-stündiger angiogener Stimulation durch VEGF führte hingegen nur zu minimalen Veränderungen der miRNA Expression. Die *in vivo* Versuche im OIR-Modell zeigten eine stabile retinale Expression der im *in vitro* Modell als VEGF-abhängig charakterisierten miRNAs.

### 3.4.2.1 miRNA Profil in HRMVECs

Die in unseren Daten in HRMVECs stark exprimiert vorgefundenen miRNAs stimmen weitgehend mit Daten von Voellenkle *et al.* (182) überein, welche 2012 Sequenzierdaten zu Endothelzellen veröffentlichten. Jene Arbeit beschreibt für HUVECs, in Übereinstimmung mit unseren Daten für HRMVECs, dass die miR-21-5p die meist exprimierte miRNA ist (unter Normoxie lag die Expression bei ca. 32 % des miRNoms in HUVECs; im Vergleich dazu lag die Expression in HRMVECs unter Hungerbedingung bei ca. 45 % des miRNoms und sank unter angiogener Stimulation auf 37 %). Auch für miR-126-3p, welche bei den HRMVECs am zweithäufigsten exprimiert wird (ca. 6 %), zeigten Voellenkle *et al.* ein Expressionsniveau von ebenfalls ca. 6 % des miRNoms unter Normoxie. Die miRNAs miR-100-5p, miR-30a-5p, miR-29a-3p, miR-20a-5p, miR-31-5p, miR-17-5p und miR-93-5p stellen in beiden Endothelzellarten mind. 1 % des miRNoms, während die miRNAs miR-126-5p, miR-27a-3p, miR-19a-3p, let-7i-5p, miR-34a-5p und miR-106-5p nur in HRMVECs mehr als 1 % des miRNoms ausmachen. Diese Ergebnisse stimmen in Teilen (für miR-19a-3p, miR-27a-3p und miR-126-5p) mit auf Microarrays basierenden Beobachtungen von McCall *et al.* in verschiedenen Endothelzellarten überein (183). Auch McCall *et al.* beschreiben eine starke Expression von miR-21-5p, miR-30a-5p, miR-20a-5p und miR-31-5p

(183). Einzelne in unseren HRMVEC Versuchen stark exprimierte miRNAs, wie let-7i-5p, miR-34a-5p und miR-106-5p sind bisher nicht in Endothelzellen beschrieben. Allerdings liegen bislang auch nur wenige Berichte zum miRNom von Gefäßendothelzellen und keine Beobachtungen zu HRMVECs vor. Die weitreichende Übereinstimmung unserer Daten mit den wenigen Berichten aus anderen Endothelzellarten spricht für ein weitestgehend zellartspezifisches miRNA Profil, wie es auch von McCall *et al.* (183) postuliert wurde und unterstreicht die Validität der in diesem Projekt erhobenen Daten, inklusive der neu identifizierten in HRMVECs stark exprimierten let-7i-5p, miR-34a-5p und miR-106-5p.

### 3.4.2.2 Änderung des miRNA Profils unter angiogener Stimulation *in vitro*

Insgesamt blieb das miRNA Profil relativ stabil in den fünf verschiedenen Gruppen. Dennoch gab es zwischen den Gruppen angiogene Stimulation und Hungerbedingung einzelne miRNAs, die signifikant und auch relevant unterschiedlich exprimiert waren, oder die besonders stark exprimiert und zusätzlich signifikant um mindestens 15 % verändert waren.

Bei der Hungerbedingung handelte es sich, zumindest zu Beginn, trotz Zugabe von FCS und damit auch diverser Wachstumsfaktoren, um ein relativ karges Umfeld für die Zellen, was an einer Retraktion von Zellausläufern auch morphologisch erkennbar war. Um ein Absterben der Zellen während des Versuchs sicher auszuschließen, wurde das Medium, dem zu Beginn 2 % FCS zugesetzt war, mit steigendem FCS-Gehalt regelmäßig gewechselt, bis eine finale Konzentration von 20 % FCS während der letzten 12 h des Versuchs erreicht war. So überlebten die Zellen die komplette Versuchsdauer auch unter Hungerbedingung und zeigten nach 12 h Inkubation mit 20 % FCS (am Ende des Versuchs, vor der Zellyse) keine Retraktion. Die notwendige Gabe der großen Menge an FCS in der Kontrollgruppe kann dazu beigetragen haben, dass ein Großteil der veränderten miRNAs nur gering ausgeprägte Veränderungen zeigte (der maximale Expressionsunterschied in den NGS-Daten unter den miRNAs, die mittels qPCR in unabhängigen Versuchen bestätigt werden konnten, lag bei -2,39 (Log2)). Es wurde bereits berichtet, dass FCS in HUVECs konzentrationsabhängig die Expression von miR-130a, die an der Regulation von angiogenen Prozessen beteiligt ist, steigert (226). In unseren NGS-Daten war die Expression von hsa-miR-130a zwischen Hungerbedingung und angiogener Stimulation vergleichbar, was auf eine angiogene Aktivierung der Zellen in beiden Gruppen hindeuten kann.

Das Medium zur angiogenen Stimulation enthielt 5 % FCS, alle weiteren im Kit enthaltenen Wachstumsfaktoren sowie zusätzlich rekombinantes VEGF-A in relativ hoher Konzentration (25 ng/ml). Im Vergleich von Hungerbedingung und angiogener Stimulation fanden sich in unabhängigen Versuchen mit

verschiedenen Methoden (Sequenzierung und qPCR) einige reproduzierbar signifikant und relevant veränderte miRNAs. Vier stark veränderte miRNAs (hsa-miR-139-5p/-3p und hsa-miR-335-5p/-3p) konnten mittels qPCR validiert werden. Diese und weitere fünf miRNAs, die sehr stark exprimiert waren, und eine signifikante Expressionsänderung von mind. 15 % in den NGS-Daten zeigten (miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-126-5p und miR-126-3p) wurden weitergehend untersucht und sollen auch im Folgenden diskutiert werden. Als gefäßaktive, sogenannte (pro-)AngiomiRs sind die miRNAs miR-21-5p und miR-126-5p bereits bekannt (179), wobei in unseren Versuchen miR-21-5p unter der angiogenen Stimulation weniger exprimiert wurde, als unter Hungerbedingung, während miR-126-5p vermehrt exprimiert wurde.

Einige der genannten miRNAs sind in einer klinischen Studie als möglicherweise mit der feuchten AMD assoziiert gefunden worden: so verglichen Ertekin *et al.* die miRNA Plasmaspiegel von Patienten mit feuchter Makuladegeneration mit den Spiegeln von Kontrollpatienten, welche keine degenerativen Veränderungen der Netzhaut zeigten mittels qPCR (227). Dabei stellten sie fest, dass bei nAMD Patienten die Plasmaspiegel verschiedener miRNAs, unter anderem von miR-335-5p und miR-21-5p, deutlich niedriger waren, als bei Kontrollpatienten. Dies deckt sich mit unseren *in vitro* Versuchen, in denen diese beiden miRNAs in der Gruppe der angiogenen Stimulation im Vergleich zur Hungerbedingung weniger stark exprimiert waren. Die miR-139-3p, welche in den HRMVECs in der Gruppe der angiogenen Stimulation vermehrt exprimiert wurde, trat bei Ertekin *et al.* nur in der Gruppe der AMD Patienten auf. Ein Auffinden derselben miRNAs im Plasma von AMD Patienten, die auch in den HRMVECs durch die Stimulationsbedingungen verändert gefunden wurden, spricht für einen Zusammenhang mit den proliferativen Prozessen, wie sie durch die vermehrten VEGF-Spiegel im Glaskörper von AMD Patienten vorgefunden werden. Obwohl die miRNAs im Plasma bestimmt wurden, ist ein Zusammenhang mit Neovaskularisationen dabei sehr wohl vorstellbar, denn miRNAs sind relativ stabil und können durch exosomalen Transport auch an anderen Orten, als ihrem Produktionsort wirken (228, 229). Ertekin *et al.* beschrieben die miR-29a-3p ausschließlich im Plasma von AMD Patienten (227). Deren Expression war in HRMVECs *in vitro* unter angiogener Stimulation allerdings reduziert.

Insgesamt zeigen Studien zur Expression von miRNA bei AMD jedoch ein recht uneinheitliches Bild und es werden nur selten dieselben miRNAs in verschiedenen Studien als verändert gefunden (230-233), was unter anderem an den unterschiedlichen Methoden (Nachweis durch Hybridisierung, qPCR oder Sequenzierung) und der Verwendung verschiedener Materialien liegen kann. Zusätzlich ist auch mit kontextabhängig unterschiedlichen miRNA Profilen zu rechnen (234).

Bei Patienten mit einer proliferativen vitreoretinalen Erkrankung wurde miR-21 im Glaskörper (235), bzw. im Plasma (236) erhöht gefunden. Die miR-29a, die in unseren Daten unter angiogener Stimulation weniger exprimiert wurde, fanden Chen *et al.* beim Vergleich von OIR-Tieren mit NOIR-Tieren als erhöht (237). Es handelt sich hierbei um *in vivo* Daten, die natürlich schwierig mit unseren *in vitro* Daten zu vergleichen sind.

Aniogeneseprozesse und deren Beeinflussung durch miRNA wurden im Bereich der Tumorbilogie eingehender untersucht. Sánchez *et al.* berichten, dass in Exosomen, die von Prostatakrebszellen (*in vitro*) abgegeben werden, miR-100-5p und miR-21-5p am häufigsten vertreten waren. Eine Transfektion von Prostata-Fibroblasten mit miR-100-5p, miR-21-5p und miR-139-5p führte zu einer gesteigerten Bildung von Matrixmetalloproteinasen (238), die z.B. am Abbau der Basalmembran von Gefäßen und damit auch an Angiogenese beteiligt sind. Andere Daten beschreiben z.B. eine Rolle von miR-100-5p als Tumorsuppressor in Magenkarzinomen (239), was jedoch kein Widerspruch sein muss, da die Wirkung in Tumor- und Endothelzellen unterschiedlich sein kann.

Die Gene Ontology Enrichment Analyse zeigte für die weiter betrachteten miRNAs einen potentiellen Zusammenhang mit Hypoxie, dem Blutgefäßsystem sowie Angiogenese, bzw. deren Regulation. Daneben wurden jedoch noch weitere biologische Prozesse in der GO Enrichment Analyse gefunden, an denen die untersuchten miRNAs beteiligt sein könnten, die derzeit kaum bzw. gar nicht mit Angiogenese in Verbindung gebracht werden. Da in den angiogen stimulierten Gruppen VEGF-A (25 ng/ml) bei weitem den größten Anteil an den Wachstumsfaktoren im Medium ausmachte und einige der Signalwege, die von den einzelnen miRNAs beeinflusst werden, VEGF abhängig sind, ist von einer vornehmlich VEGF-bedingten Beeinflussung des miRNA Profils in den angiogen stimulierten Gruppen auszugehen.

### 3.4.2.3 Beeinflussung des miRNA Profils durch VEGF-Inhibitoren

Ein wichtiger Aspekt des Projekts war auch die Untersuchung des Einflusses verschiedener VEGF-Inhibitoren auf das miRNA Profil von HRMVECs. Die drei in dem Projekt eingesetzten VEGF-Inhibitoren (Aflibercept, Bevacizumab und Ranibizumab) zeigen auf molekularer Ebene unterschiedliche Effekte: So berichteten beispielsweise Klettner *et al.*, dass Bevacizumab sich in RPE (Retinales Pigmentepithel) Zellen anreichert, während für Ranibizumab keine Anreicherung festzustellen war (240). Es ist jedoch bekannt, dass alle drei VEGF-Inhibitoren in RPE-Zellen aufgenommen werden (240, 241). Auch für bovine retinale mikrovaskuläre Zellen wurde eine intrazelluläre Aufnahme und eine teilweise Akkumulierung der VEGF-Inhibitoren beschrieben (242, 243). Weiterhin zeigen Papadopoulos *et al.* in ihrer Studie, dass sich die

## Präklinische Aspekte

drei Inhibitoren bezüglich ihrer Assoziations- und Dissoziationskonstanten an VEGF-A<sub>165</sub>, bzw. ihren Effekten auf eine VEGF-A induzierte Aktivierung der VEGF-Rezeptoren deutlich unterscheiden (192).

Auch *in vivo* sind einige Unterschiede zwischen den drei Substanzen bekannt: Nach einer intravitrealen Injektion von Aflibercept bzw. Ranibizumab bei Affen konnten Tschulakow *et al.* beide Substanzen in den Glomeruli nachweisen, wobei nach Aflibercept Behandlung weniger VEGF in den Podozyten zu finden war, als nach Ranibizumab Injektion (244). Ein 2017 erschienener Cochrane Review zum Einsatz von VEGF-Inhibitoren beim diabetischen Makulaödem untersuchte 24 Studien und zeigte, dass alle drei Substanzen den Visus von Patienten mit DMÖ verbessern, Aflibercept jedoch zumindest kurzfristig gesehen minimal wirksamer sein soll, als die beiden anderen Substanzen (245). Auch pharmakokinetisch unterscheiden sich die Substanzen deutlich voneinander (siehe auch Abschnitt 1.3.2), wobei Ranibizumab am schnellsten aus dem systemischen Kreislauf ausgeschieden wird (95, 142, 246).

In dieser Arbeit wurde nun unter anderem untersucht, ob sich die drei VEGF-Inhibitoren, eingesetzt in der Konzentration, die nach einer intravitrealen Injektion bei Erwachsenen im Glaskörper resultiert, auch in ihrer Beeinflussung des miRNA Profils von HRMVECs unterscheiden. Trotz der vielfältigen Unterschiede auf molekularer Ebene und *in vivo* waren unter den gewählten Versuchsbedingungen keine signifikanten und relevanten Unterschiede zwischen den Substanzen zu verzeichnen.

Dies könnte z.B. im Versuchsablauf begründet sein. Im hier vorgestellten Projekt wirkte ab Versuchsbeginn für 12 h Wachstumsmedium auf die Zellen ein, dem zu den bereits enthaltenen Faktoren, wie z.B. Heparin, EGF, bFGF, VEGF und FBS noch zusätzliches rekombinantes VEGF-A hinzugefügt worden war. Es herrschte also eine durch VEGF-A noch verstärkte proangiogene Umgebung vor, bevor die verschiedenen VEGF-Inhibitoren für weitere 12 h im Überschuss zugegeben wurden. In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung wird in einigen veröffentlichten Arbeiten, in denen die Eigenschaften verschiedener VEGF-Inhibitoren verglichen werden, VEGF entweder zusammen mit den VEGF-Inhibitoren auf die Zellkultur gegeben (247) oder nach Vorinkubation mit VEGF-Inhibitoren (248). Dieses Vorgehen spiegelt die klinische Situation *in vivo* jedoch nur unzureichend wider, da die VEGF-Inhibitoren therapeutisch meist erst dann intravitreal appliziert werden, wenn es bereits zu Neovaskularisationen oder Proliferationen aufgrund vermehrter VEGF-Ausschüttung gekommen ist. Dieser Situation wird im hier angewendeten Versuchsaufbau Rechnung getragen, ähnlich wie bei Deissler *et al.* (243). Im Unterschied zur Situation *in vitro* wird klinisch *in vivo* auch nach Zugabe der VEGF-Inhibitoren weiter VEGF-A gebildet. Es ist außerdem möglich, dass das in der Zellkultur vorgelegte VEGF-A zu einer nachhaltigen Aktivierung der

VEGF-abhängigen Signalübertragung geführt hat (249), die im begrenzten Zeitrahmen der Untersuchung keinen weiteren Einfluss der Inhibitoren auf das miRNA Profil zuließ.

Der Zeitpunkt 12 h nach Zugabe von VEGF-Inhibition wurde gewählt, da die Wirkung von VEGF-Inhibitoren nach intravitrealer Applikation meist sehr schnell einsetzt. Bei Kindern mit einer aggressiven posterioren ROP kommt es so bereits innerhalb von 24 h zu einer ersten Verbesserung der Tortuositas der Gefäße (250). Da das miRNA Profil dem Phänotyp vorausgehen sollte, wurde es bereits nach 12 h Anwesenheit der VEGF-Inhibitoren charakterisiert. Dieser Zeitpunkt könnte einerseits zu spät gewesen sein, sodass die miRNAs sich bereits auf das Ausgangsniveau eingependelt hatten oder zu früh und eine Änderung des Profils war nach 12 h VEGF-Inhibition noch nicht eingetreten. Gegen einen zu frühen Zeitpunkt unserer Analyse sprechen allerdings die Ergebnisse von Goto *et al.*, die in ihren Untersuchungen zum Einfluss von Inhalationsnarkotika auf das miRNA Profil im Hippocampus bereits nach 6 h Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsmethoden beobachteten (251). In weiteren Versuchen wäre es demnach sinnvoll, Veränderungen der miRNA Expression im Zeitverlauf zu untersuchen und zu überprüfen, ob zu einem anderen Zeitpunkt Unterschiede zwischen den VEGF-Inhibitoren zu sehen sind. In der Literatur sind bis dato noch keine Studien zu finden, in denen untersucht wird, ob die drei VEGF-Inhibitoren einen Einfluss auf die miRNA Expression haben, bzw. sich in ihrem Einfluss unterscheiden.

Die Ergebnisse aus diesem Versuch lassen den Schluss zu, dass die verschiedenen VEGF-Inhibitoren zumindest nach 12 h keinen intrinsischen Effekt auf das miRNA Profil ausüben.

#### **3.4.2.4 miRNA Expression im OIR-Modell mit und ohne VEGF-Inhibition**

Im OIR-Mausmodell, sollte untersucht werden, ob die *in vitro* beobachteten Ergebnisse in ein *in vivo* Modell übertragbar sind. Die betrachteten miRNAs, die in der Zellkultur eine mind. 2-fache Expressionsänderung zeigten, oder sehr stark exprimiert wurden und gleichzeitig eine Änderung von mind. 15 % zeigten, waren zwischen den OIR- und den NOIR-Tieren nur geringfügig verändert. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Liu *et al.*, die kürzlich Microarray Daten zum Vergleich der miRNA Expression in Retinae von OIR- und NOIR-Tieren an P17 veröffentlichten, die zwar statistisch signifikante jedoch nur geringfügige Unterschiede zeigten (13 miRNAs waren in den OIR-Retinae im Vergleich zu NOIR-Retinae auf das mind. 1,25fache erhöht und 10 miRNAs waren auf das 0,75fache herunter reguliert) (205). Diese publizierten Unterschiede waren allesamt niedriger als die in dieser Arbeit gewählte Schwelle für biologisch relevante Veränderung. Bei Wang *et al.* wurden insgesamt 32 miRNAs gefunden (Microarray),

die eine mindestens 2-fache Änderung zwischen OIR- und NOIR-Tieren zeigten. Hiervon konnten allerdings nur die beiden miRNAs miR-130a-3p und miR-5107-5p mittels qPCR validiert werden (252).

Der Vergleich zwischen OIR und NOIR korrespondiert mit dem Vergleich zwischen angiogener Stimulation und Hungerbedingung, da sowohl im OIR-Modell, als auch in der Gruppe der angiogenen Stimulation eine von VEGF-A dominierte proangiogene Umgebung vorherrscht. Das OIR-Modell ist dennoch kein reines Abbild einer angiogenen Stimulation, denn durch Hypoxie kommt es außerdem vermehrt zu Zellstress und Zelltod (253), was ebenfalls Einfluss auf die miRNA Expression haben kann. Dies ist nur einer der möglichen Gründe, weshalb die *in vitro* Ergebnisse nicht in die *in vivo* Situation übertragen werden konnten. Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist, dass *in vitro* humane Zellen betrachtet wurden, die sich schon allein aufgrund der Zellkultursituation anders verhalten können, als murines Gewebe *in vivo* (157, 158). Zudem machen retinale Endothelzellen, die in den *in vitro* Versuchen isoliert betrachtet wurden, *in vivo* nur einen geringen Anteil aller retinaler Zellen aus. Subtile endothelzellspezifische Veränderungen können so in der Betrachtung des Gesamtgewebes überlagert worden sein. Durch Aufreinigen endothelialer Zellen aus retinalen Präparationen könnte diese Schwierigkeit in künftigen Experimenten überwunden werden. In den Untersuchungen von Liu *et al.* (205) und Wang *et al.* (252) zu miRNAs im OIR-Modell wurde jedoch jeweils auch die gesamte Retina betrachtet. Zudem beschrieben Liu *et al.* eine insgesamt verringerte Expression von miRNAs in OIR-Tieren gegenüber NOIR-Kontrollen. Dies führten die Autoren auf eine reduzierte Expression des miRNA-verarbeitenden Enzyms Dicer in OIR-Tieren zurück (205). Basierend auf den Daten von Liu *et al.* untersuchten auch wir die Expression von Dicer, fanden jedoch an P15 keinen Unterschied in der Expression zwischen NOIR- und OIR-Tieren (eigene Daten, hier nicht gezeigt). Bei Liu *et al.* wurde sowohl die miRNA, als auch die Dicer-Expression an P17 betrachtet, während wir bereits P15 für die Quantifizierung der miRNA Expression herangezogen haben. Es könnte natürlich sein, dass der Zeitpunkt P15 noch zu früh ist, um Veränderungen im miRNA Profil zu sehen. Die Entscheidung fiel in unserem Projekt auf P15, da davon ausgegangen werden muss, dass miRNA Veränderungen den morphologisch sichtbaren Veränderungen der Retina vorausgehen. Da der Höhepunkt dieser Veränderungen an P17 liegt (113), ist es unserer Meinung nach zu spät, erst an diesem Tag das miRNA Profil zu untersuchen, wenn zu klären ist, ob miRNA Veränderungen kausal die morphologisch sichtbaren Veränderungen bedingen. In zukünftigen Projekten könnte es sinnvoll sein, *in vivo* einen zeitlichen Verlauf der miRNA Expression nach dem Aufenthalt im Sauerstoffinkubator zu betrachten.



Auch im OIR-Modell wurde der Einfluss einer VEGF-Inhibition auf die miRNA Expression untersucht, wobei kein Unterschied zwischen einer Injektion von Eylea® und einer Injektion von DPBS zu sehen war. Wie bei Tokunaga *et al.* zeigte sich jedoch eine deutlich größere avaskuläre Fläche nach Injektion von Eylea® im Vergleich zu DPBS (eigene Daten hier nicht gezeigt) (254), was einen Hinweis auf die Wirksamkeit der Injektion gibt. Die Injektion des VEGF-Inhibitors erfolgte in Übereinstimmung mit Feng *et al.* (255) an P12, da bekannt ist, dass die mRNA für VEGF schon innerhalb weniger Stunden nachdem die Tiere aus dem Sauerstoffinkubator wieder an Raumluft kommen auf ein Vielfaches ihres Ausgangswerts ansteigt (53). Durch eine frühe Injektion des VEGF-Inhibitors an P12 sollte das gebildete VEGF sofort abgefangen werden. Dennoch zeigte sich kein Unterschied zu den DPBS injizierten Kontrollen. Die Gründe hierfür können vielfältig sein und entsprechen den zuvor für den Vergleich von NOIR- und OIR-Tieren genannten. Bei Tokunaga *et al.* wurde Aflibercept dagegen erst an P14 injiziert (254). Es wäre also auch vorstellbar, dass eine spätere Injektion von Aflibercept ein anderes Ergebnis erbracht hätte.

Abschließend bleibt festzustellen, dass eine Übertragung von Ergebnissen der relativ gut definierten *in vitro* Situation der HRMVEC-Zellkultur in das *in vivo* OIR-Modell aufgrund der dort deutlich schlechter definierten Rahmenbedingungen schwierig war. Keine der *in vitro* als verändert gefundenen miRNAs war *in vivo* zu reproduzieren. Ein weiterer bisher noch nicht genannter Faktor ist auch die intraindividuelle Varianz, die man an den relativ starken Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren, bzw. sogar zum Teil zwischen rechtem und linkem Auge erkennen kann (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27).

#### **3.4.2.5 Beeinflussung der Gefäßsprossung in HRMVEC-Sphäroiden durch hsa-miR-335-5p**

Die Wirksamkeit einer Transfektion von Zellen mit einer einzelnen miRNA-mimic, bzw. des Knock-Downs einer einzelnen miRNA wurden sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bereits mehrfach gezeigt (187, 256): Die Überexpression der miR-126 reduzierte die Tube Bildung im Tube Formation Assay sowie die Größe der CNV-Läsion im Mausmodell (257), während der Knock-Down der miR-155 zu einer verringerten Reaktion von Zellen auf einen VEGF Stimulus, bzw. zu einer reduzierten Neovaskularisation im OIR-Modell bzw. im CNV-Modell führt (256). Die Transfektion von HRMVECs mit miR-335-5p hatte in unserem Versuchsansatz keinen Einfluss auf die sphäroidalen Aussprossungen (siehe auch Abschnitt 3.3.2.5).

In Abbildung 28 wird die Vielfalt von Zielmolekülen der miRNAs miR-335-5p und -3p deutlich. Aus dem Bereich der Augenheilkunde liegen zu diesen Zielmolekülen jedoch nur wenige Erkenntnisse vor. Im Bereich der Tumorbilogie sind einige dieser Targets näher charakterisiert und so wird miR-335 eine

## Präklinische Aspekte

Regulation von MMP2 und MMP9 über *PAX6* (258), eine Aktivierung der Ras/ERK-Kaskade in Kolorektalkarzinom-Zellen (259) sowie eine inhibierende Wirkung auf die MAPK in T24 Zellen (humane Harnblasen-Tumorzellen) zugeschrieben (260). Diese Targets sind auch in die VEGF-A abhängige Signaltransduktion eingebunden und könnten daher auch bei Erkrankungen wie der Frühgeborenen-retinopathie von Bedeutung sein.

Transfizierte HRMVECs zeigten im Vergleich zu den nicht transfizierten HRMVECs ein etwas stärker (nicht signifikant) ausgeprägtes Sprouting (siehe Abbildung 31a und b), dieses war jedoch unabhängig vom eingebrachten Konstrukt (siehe Abbildung 31b), was auf einen Effekt der Transfektion an sich hinweist und nicht für spezifische Effekte der miR-335-5p-Mimic spricht. Da diese Beobachtung bei starker Streuung für drei verschiedene Konzentrationen von VEGF-A nicht reproduzierbar war, muss man davon ausgehen, dass es sich dabei eher um Zufall, als um einen wirklichen Effekt handelte.

Allgemein war der Sproutingassay durch die Verwendung dreier unterschiedlich behandelter HRMVEC-Kulturen (untransfiziert, mit microRNA-Mimic bzw. Kontroll-Mimic transfiziert) in der praktischen Umsetzung schwierig. Trotz der Aufteilung der Gruppen auf drei verschiedene 24-Well Platten gab es einige Versuche, in denen sehr viele Sphäroide auf den Wellboden abgesunken und zerfallen waren, welche dann von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Außerdem muss beachtet werden, dass ein gemeinsamer etwas größerer Gelansatz für die drei Gruppen vorbereitet wurde, sodass der Teil des Gels, der für die zweite und dritte Gruppe verwendet wurde, länger vorinkubierte, als der Teil für die erste Gruppe. Obwohl das Gel in der Zwischenzeit auf Eis gelagert und darauf geachtet wurde, möglichst zügig zu arbeiten, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Konsistenz des Gels sich minimal zwischen den Gruppen unterschied. Ein weiterer Faktor ist die Transfektion an sich. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Transfektion trotz identischem Vorgehen nicht immer gleich erfolgreich verläuft.

Im Rahmen der methodischen Einschränkungen des Sproutingassays ließ sich kein isolierter Einfluss von miR-335-5p auf das Sprossverhalten von HRMVECs nachweisen. Der Sproutingassay ist jedoch möglicherweise aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Sphäroiden, den verschiedenen Gelen und den oben beschriebenen Problemen inklusive der damit einhergehenden Ungenauigkeit nicht exakt genug, um feine Unterschiede erkennen zu können. Dies schließt nicht aus, dass miR-335-5p *in vivo* unter bestimmten Bedingungen, die durch weitere Wachstumsfaktoren und spezifische miRNA Profile gekennzeichnet sind, eine angiomodulative Wirkung entfaltet. So waren bei Wang *et al.* nach Transfektion mit miR-93 die Neovaskularisationen im CNV-Modell kleiner als bei

Kontrolltransfektion. In ihren *in vitro* Untersuchungen sahen sie einen negativen Effekt der miR-93 auf die Proliferation von Endothelzellen, konnten diesen Effekt jedoch im Tube Formation Assay nicht bestätigen (261).

#### 3.4.2.6 Abschließende Bewertung der Untersuchung von miRNA Profilen

Mit diesem Projekt wurde erstmalig das miRNA Expressionsprofil von HRMVECs, die an vielen retinalen vaskulären Erkrankungen beteiligt sind, unter verschiedenen Bedingungen mittels Next Generation Sequencing charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der Großteil dieses Profils mit anderen Endothelzellarten übereinstimmt. In der funktionellen Analyse beeinflusste die starke Überexpression der miR-335-5p das Sprossverhalten von HRMVEC-Sphäroiden *in vitro* nicht. Für andere miRNAs, wie der miR-126 gibt es bereits Berichte, in denen eine Überexpression zu signifikanten Effekten in Bezug auf die Migration und die Tube-Ausbildung von mikrovaskulären Endothelzellen führt (187) oder auch der miR-93, bei der *in vivo* ein Effekt der Transfektion nachgewiesen wurde (261). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten stehen jedoch im Einklang mit den Daten von Selbach *et al.*, die verdeutlichen, dass eine einzelne miRNA Gattung zwar in der Lage ist, die Translation zahlreicher Gene zu beeinflussen, diese Beeinflussung jedoch meist nur gering ausfällt (262). Es ist vielmehr die Summe von in bestimmten Mustern zusammenwirkenden miRNAs, die spezifische biologische Effekte hervorbringt.

Insgesamt zeigte sich das miRNA Profil als relativ robustes System, das trotz extremer Bedingungen (Hungerbedingung vs. Angiogene Stimulation) innerhalb von 12-24 Stunden in weiten Teilen unverändert blieb. Die eingesetzten VEGF-Inhibitoren hatten unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen relevanten Einfluss auf das miRNA Profil von HRMVECs und es war kein intrinsischer Effekt der Substanzen mit Auswirkung auf das miRNA Profil zu erkennen. Auch *in vivo* waren die betrachteten miRNAs stabil unter OIR- und NOIR-Bedingungen. Auch hier bewirkten VEGF-Inhibitoren kaum Änderungen der Expression.

In Folgeprojekten sollte der Zeitverlauf der miRNA Expression sowohl für HRMVECs *in vitro*, als auch im OIR-Modell überprüft, sowie weitere Zeitpunkte für die anti-VEGF Zugabe/Injektion untersucht werden. Als weitere Möglichkeit der funktionellen Untersuchungen der Transfektion mit bestimmten miRNAs wäre der Tube Formation Assay zu sehen. Zusätzlich könnte die Sequenzierung kleiner RNAs mit einer Transkriptomanalyse kombiniert werden. Neben miRNAs bedürfen auch andere nicht-codierende RNAs der weiteren Untersuchung.

### 3.5 Zusammenfassung präklinischer Teil

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im präklinischen Teil ein *in vitro* Modell für die neuro-vaskuläre Interaktion etabliert. Untersuchungen an diesem Modell zeigten, dass VEGF-Inhibitoren *in vitro* einen Einfluss auf die neuro-vaskuläre Interaktion haben können. Im zweiten präklinischen Projekt sah man, dass das miRNA Profil von humanen retinalen Endothelzellen zwar durch die angiogene Stimulation, jedoch nicht von VEGF-Inhibitoren beeinflusst wird.

Das *in vitro* Modell der neuro-vaskulären Interaktion setzte sich aus murinen primären retinalen neuronalen Zellen und HUVEC Sphäroiden zusammen. Mit diesem Modell war es möglich, die aus der *in vivo* Situation bereits bekannte Beeinflussung des Gefäßwachstums durch neuronale Zellen (113, 146) auch *in vitro* abzubilden. Eine VEGF-Inhibition hemmte die induzierte Gefäßsprossung nicht vollständig, sodass die Interaktion zumindest *in vitro* nicht nur auf VEGF-A zurückzuführen ist. Es kann also sein, dass der klinische Einsatz eines VEGF-Inhibitors bei Frühgeborenen zwar zu einer kompletten Hemmung des intraokularen VEGF führt, es jedoch weiterhin zu einer Interaktion zwischen neuronalen Zellen und dem vaskulären System der Retina kommt, was sich möglicherweise positiv auf die Vaskularisierung der Netzhaut auswirken könnte. Für eine weitergehende Bewertung könnte anhand des *in vitro* Modells noch untersucht werden, inwiefern die VEGF-Inhibition einen negativen Einfluss auf die retinalen neuronalen Zellen hat.

Im nächsten Schritt wurde die vaskuläre Komponente näher untersucht und ein Schwerpunkt auf das noch ungeklärte miRNA Profil retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen gelegt. Dabei konnte zum ersten Mal das miRNA Profil dieser Zellart charakterisiert werden, welches in weiten Teilen mit dem anderer Endothelzellen übereinstimmt. Als zusätzliche miRNAs, die möglicherweise HRMVEC spezifisch sind, wurden die miRNAs let-7i-5p, miR-34a-5p sowie miR-106-5p identifiziert. Unter angiogener Stimulation war die größte Veränderung im miRNA Profil im Vergleich zur Hungerbedingung zu sehen, während die Zugabe der drei VEGF-Inhibitoren Avastin®, Eylea® und Lucentis® in keiner Beeinflussung des miRNA Profils resultierte und auch kein Unterschied zwischen den Substanzen zu sehen war.

Im ersten Teil konnte aufgrund des Versuchsaufbaus nur Eylea® verwendet und die Substanzen somit nicht miteinander verglichen werden, im zweiten Teil gab es keine Unterschiede zwischen den drei VEGF-Inhibitoren. Somit sprechen die in dieser Arbeit erhaltenen präklinischen Ergebnisse nicht für oder gegen die Anwendung eines bestimmten VEGF-Inhibitors, auch wenn andere Daten gezeigt haben, dass molekulare (240-243) und *in vivo* (244, 245) Unterschiede zwischen den Substanzen existieren.

Mit dem folgenden Teil dieser Arbeit sollte deshalb der Einsatz von VEGF-Inhibitoren in der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie *in vivo* am Menschen untersucht werden: einerseits mit Hilfe von nicht-interventionellen Registerdaten, andererseits im Rahmen der klinischen Studie CARE-ROP, deren Konzeption und Betreuung Teil dieser Arbeit war. In dieser interventionellen klinischen Studie wurden zwei niedrige Dosierungen des VEGF-Inhibitors Ranibizumab auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit für Frühgeborene geprüft.



## 4 Klinische Aspekte

Im folgenden Teil dieser Arbeit wird das Thema Frühgeborenenretinopathie und deren Behandlungsmöglichkeiten im Rahmen zweier klinischer Projekte bearbeitet. Dabei wurde im ersten Projekt der Status quo der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland unter besonderer Betrachtung der VEGF-Inhibition anhand von Daten aus dem Retina.net ROP Register untersucht. Der zweite Teil bestand aus der Konzeption und Betreuung der klinischen Studie CARE-ROP (**C**omparing **A**lternative **R**anibizumab dosages for safety and **E**fficacy in **R**etinopathy **O**f **P**rematurity; NCT02134457) und der Auswertung der vorläufigen Sicherheitsdaten, welche zum Zeitpunkt der Data Safety Monitoring Board (DSMB) Überprüfung am 09. März 2016 zur Verfügung standen. In einem methodischen Vorprojekt zur CARE-ROP Studie wurden Einflussparameter der präanalytischen Prozessierung von Blutproben auf die Messung systemischer VEGF-A-Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse dieses Projekts werden ebenfalls im folgenden Teil der Arbeit dargestellt.

### 4.1 Materialien und Methoden

#### 4.1.1 Retina.net ROP Register

Der Retina.net Forschungsverbund der Retinologischen Gesellschaft rief 2012 das deutsche Frühgeborenenretinopathie Register unter Leitung der Universitätsaugenklinik Freiburg ins Leben (DRKS00004522). Ziel des Registers ist es, möglichst viele Daten von behandelten Fällen der Frühgeborenenretinopathie zu sammeln und gemeinsam auszuwerten. Nur so ist es möglich, bei dieser sehr selten vorkommenden Erkrankung Behandlungsmuster, Verläufe, Komplikationen und mögliche Langzeitschäden zu erkennen.

Beim Frühgeborenenretinopathie Register handelt es sich um eine rein epidemiologische, nicht-interventionelle Datensammlung. Das heißt, es wird nicht in die Behandlung eingegriffen und es gibt keine Vorschriften in Bezug auf die durchgeführten Untersuchungen sowie die Art und Häufigkeit der Nachkontrollen. Es können alle behandelten Fälle, unabhängig von der Art der Therapie (Laser- oder Kryokoagulation, intravitreale VEGF-Inhibition oder operative Methoden) in das Register eingetragen werden. Im Vergleich zu klinischen Studien, bei denen es häufig sehr enge Ein- und Ausschlusskriterien gibt, spiegelt dieses Vorgehen eher den klinischen Alltag wider. Eine Limitation gegenüber klinischen Studien stellt dagegen die teilweise inkomplette bzw. zwischen den Zentren unterschiedliche Datenerhebung dar.

## Klinische Aspekte

Die Teilnahme am Register steht prinzipiell allen deutschen Zentren, welche Kinder mit Frühgeborenenretinopathie behandeln, offen. Voraussetzung ist ein positives Ethikvotum für das jeweilige Zentrum. In dieser Arbeit werden Daten von 90 behandelten Kindern mit Frühgeborenenretinopathie (geboren zwischen Januar 2011 und Dezember 2013) aus neun Zentren ausgewertet. Zur Berechnung der Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie, ist zusätzlich zur Anzahl der behandelten Kinder noch die Gesamtzahl an Kindern, die im beschriebenen Zeitraum im ROP Screening waren, von den Zentren erfragt worden.

Da es sich beim Frühgeborenenretinopathie Register um eine epidemiologische Studie handelt, wurden die Daten hauptsächlich deskriptiv ausgewertet: für quantitative Variablen die Gesamtzahl (n), der Mittelwert, die Standardabweichung, sowie die Streuung der Daten (Minimum, Maximum); für qualitative Variablen ebenfalls die Gesamtzahl (n) sowie die Häufigkeit des Auftretens einer bestimmten Ausprägung.

Die Parameter, welche mit dem Register untersucht wurden, beinhalten die Inzidenzrate einer schweren Frühgeborenenretinopathie an den teilnehmenden Zentren, demographische Daten der behandelten Frühgeborenen, das vorliegende Stadium der Frühgeborenenretinopathie bei Behandlungsentscheidung, Behandlungsmuster, Wiederauftreten der Erkrankung, relevante Komorbiditäten, neonatologische Parameter und ophthalmologische oder systemische Komplikationen, die in zeitlicher Korrelation mit der Behandlung auftraten.

Aufgrund des nicht-interventionellen Charakters des Registers, sind nicht alle Daten vollständig erfasst, sodass n für jeden Parameter die Anzahl an Kindern bzw. Augen angibt, für die die zugehörigen Informationen vorlagen. Bei Parametern, welche „pro Patient“ ausgewertet wurden, ist das Kind basierend auf dem höchsten Schweregrad der Erkrankung in einem der Augen eingruppiert. Bei Auswertung „pro Auge“, sind beide Augen getrennt gelistet. In wenigen Fällen erfolgte die bilaterale Behandlung nicht am selben Tag, wobei der Tag der ersten Behandlung für die Auswertung gewertet wurde.

Die Untersuchung des Zusammenhangs demographischer bzw. neonatologischer Parameter mit einer wiederholten Behandlungsbedürftigkeit erfolgte mithilfe einer logistischen Regression. Hierbei wurden die Kovariaten Geschlecht, Gestationsalter (GA), Geburtsgewicht und initiale neonatologische Betreuung (am Behandlungszentrum vs. von extern zuverlegt), Dauer der Sauerstoffsupplementation und Anwesenheit von Komorbiditäten (unter diesem Punkt wurden bakterielle Sepsis, systemische Mykose,



Gehirnblutung, nekrotisierende Enterokolitis und persistierender Ductus Arteriosus zusammengefasst) in die Berechnung mit einbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS, Version 21.0 (IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Die logistische Regression wurde mit dem Statistikprogramm R (R Foundation, Wien, AUT) mit Unterstützung von Prof. Dr. Daniel Böhlinger (Universitätsaugenklinik Freiburg) berechnet.

#### **4.1.2 NCT02134457-CARE-ROP: Eine klinische Studie zum Vergleich zweier Dosierungen von Ranibizumab in Bezug auf Sicherheit und Effektivität bei Frühgeborenenretinopathie**

##### **4.1.2.1 Hintergrund der klinischen Prüfung**

Die Therapie der Frühgeborenenretinopathie hat sich seit der Entdeckung der Erkrankung durch Terry (1) im Jahr 1942 stark gewandelt (siehe auch Punkt 1.2.4). Doch bis heute ist die „ideale“ Behandlungsmethode noch nicht gefunden. Seit den 90er Jahren ist die Laserkoagulation Standardtherapie (66), wobei bei dieser Therapie der zu diesem Zeitpunkt noch nicht vaskularisierte Teil der Netzhaut zerstört wird, was im späteren Leben zu Gesichtsfeldeinschränkungen führen kann. Außerdem kann es durch die Laserbehandlung zu Narbenbildung und retinalen Traktionen und daraus resultierenden Makulafalten kommen (90).

Wenn man den Pathomechanismus der Frühgeborenenretinopathie näher betrachtet (siehe Punkt 1.2.3), ist es kaum verwunderlich, dass nach Einführung der VEGF-Inhibitoren für die Behandlung von retinalen Erkrankungen bei Erwachsenen, diese Medikamentenklasse nun auch immer mehr Anwendung in der Therapie von Frühgeborenen findet. In mehreren kleineren Studien, sowie einer großen randomisierten klinischen Studie (BEAT-ROP (73)) wurden hauptsächlich Bevacizumab aber vereinzelt auch Ranibizumab (75) und Aflibercept (263) in dieser Indikation untersucht. Nach Veröffentlichung der Ergebnisse der BEAT-ROP Studie, wurde die VEGF-Inhibition gemeinhin als mögliche Behandlungsoption für bestimmte Formen der Erkrankung akzeptiert (84). Dennoch ist weiterhin keiner der VEGF-Inhibitoren für die Behandlung einer Frühgeborenenretinopathie zugelassen und in den bisher mit VEGF-Inhibitoren durchgeführten klinischen Studien blieben noch einige Fragen offen. Zum Teil sollen diese mit der CARE-ROP Studie beantwortet werden.

## Klinische Aspekte

So wurde zum Beispiel nie eine Dosisfindungsstudie für die VEGF-Inhibitoren bei Frühgeborenen durchgeführt. In den meisten publizierten Daten, wie auch in der BEAT-ROP Studie, wurde die halbe Erwachsenendosis appliziert (47, 73, 263, 264). Es gibt einzelne Veröffentlichungen, welche zeigen, dass auch eine niedrigere Dosis eines VEGF-Inhibitors möglicherweise wirksam genug wäre, um die Erkrankung einzudämmen (265, 266). Zusätzlich zeigen präklinische Daten (*in vivo*) (254, 267), dass eine niedrigere Dosierung im Tiermodell möglicherweise zu einer besseren Revaskularisierung der Retina führt. Aus diesem Grund wurden in der CARE-ROP Studie nur 40 % bzw. 24 % der Erwachsenendosis eingesetzt. Erstmals war außerdem jeweils vier Wochen nach einer Injektion eine Re-Injektion derselben Dosierung laut Studienprotokoll erlaubt. So kann individuell bei jedem Kind die ideale Menge gefunden und eine Überbehandlung vermieden werden. Zusätzlich stand jederzeit eine Rescue-Behandlung (Laserkoagulation oder 0,20 mg Ranibizumab) zur Verfügung.

Ein weiterer Kritikpunkt an der BEAT-ROP Studie liegt in der mangelnden Betrachtung der systemischen Sicherheit von Bevacizumab. Es ist bekannt, dass eine intravitreale Gabe von VEGF-Inhibitoren Einfluss auf die systemischen VEGF-Spiegel haben kann. Das Ausmaß ist zumindest beim Erwachsenen für die einzelnen Substanzen unterschiedlich (95, 246). In der CARE-ROP Studie wurde anstelle von Bevacizumab der Wirkstoff Ranibizumab eingesetzt, welcher eine deutlich kürzere systemische Halbwertszeit aufweist (142, 268, 269). Dies könnte möglicherweise dazu führen, dass die systemischen VEGF-Spiegel weniger stark und nur über einen kürzeren Zeitraum absinken, wie es bei Erwachsenen Patienten von Avery *et al.* mehrfach gezeigt wurde (95, 246). Um den Aspekt der systemischen VEGF-Suppression zu überprüfen, erfolgten in der CARE-ROP Studie zu festgelegten Zeitpunkten Blutentnahmen.

### 4.1.2.2 Studiendesign und Zielparameter

Bei der CARE-ROP Studie handelt es sich um eine explorative, randomisierte, doppelblinde Phase II Studie zur Beurteilung der Sicherheit und Wirksamkeit zweier unterschiedlicher Dosierungen von Ranibizumab (0,12 mg vs. 0,20 mg) bei Kindern mit Frühgeborenenretinopathie. Zu Beginn der Rekrutierungszeit von zwei Jahren erschien es realistisch, 40 Kinder mit definierten Stadien der Frühgeborenenretinopathie in die Studie einschließen zu können. Die Rekrutierung wurde wie geplant nach zwei Jahren, aber nach Einschluss von nur 19 Kindern am 22.08.2016 regulär beendet. Last Patient Last Visit fand am 02. Januar 2017 statt.

Primärer Endpunkt der Studie war es, die klinische Wirksamkeit von Ranibizumab in der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zum Zeitpunkt 24 Wochen nach der ersten Injektion zu überprüfen. Dieser

war definiert als die Anzahl der Kinder, die keine Rescue-Behandlung während der Kernstudie benötigten. Eine Re-Injektion derselben Ranibizumab Dosierung mindestens vier Wochen nach einer Injektion wurde dabei nicht als Rescue-Behandlung, sondern als normale Behandlung im Rahmen des Studienprotokolls gewertet, wobei maximal drei Re-Injektionen laut Studienprotokoll erlaubt waren.

Die sekundären Zielparameter (bezogen auf die Kernstudie) waren es, zu überprüfen, in wie vielen Fällen es zum Rückgang der Plus Disease sowie der präretinalen Gefäßleiste kam und wie häufig die Gefäße innerhalb der Retina über die Gefäßleiste hinaus wachsen. Des Weiteren wurden die Anzahl und Art der (schwerwiegenden) unerwünschten Ereignisse, sowie die Veränderungen der systemischen VEGF-Spiegel zwischen den Therapiearmen verglichen. Auch die Anzahl an Re-Injektionen, sowie die Zahl an Patienten, bei denen die Erkrankung zu einem Stadium 4 oder 5 fortschritten, wurden einbezogen.

Im Rahmen der explorativen Endpunkte wird der Zeitraum nach der Kernstudie bis zum Ende der Follow-Up Periode (4,5 Jahre nach Ende der Kernstudie; entspricht ca. 5 Jahre nach Behandlung) untersucht. Besonderes Interesse liegt hierbei auf der Anzahl an Fällen, in denen es zu einem späten Wiederauftreten der Frühgeborenenretinopathie kommt, bzw. in denen die Erkrankung zu einem Stadium 4 oder 5 voran schreitet. Auch die Häufigkeit der späten vollständigen Vaskularisierung der peripheren Retina bis zur Ora serrata wird bestimmt.

#### **4.1.2.3 Ein- und Ausschlusskriterien**

In die CARE-ROP Studie konnten Frühgeborene, welche bilateral eine Frühgeborenenretinopathie in Zone I (Stadium 1+, 2+, 3+/- oder AP-ROP) oder in der zentralen Zone II (Stadium 3+ oder AP-ROP) aufwiesen, eingeschlossen werden (eine Beschreibung der Zonengrenzen, sowie der Stadien ist unter 1.2.5 aufgeführt). Außerdem war die Einwilligung, in diesem Fall der Eltern bzw. gesetzlichen Vertreter und die Bereitschaft an den Studienvisiten teilzunehmen nötig.

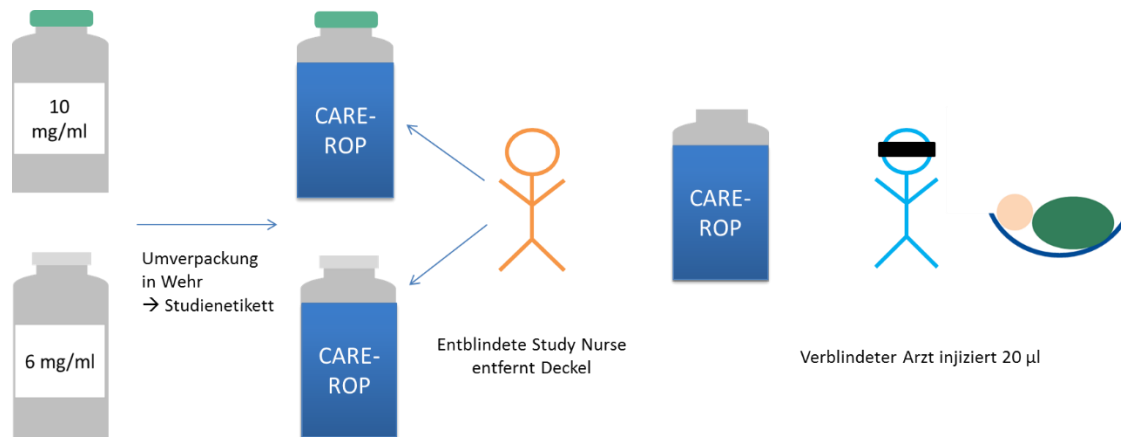
Nicht in die Studie eingeschlossen werden konnten Kinder, die aufgrund einer pädiatrischen Erkrankung keine VEGF-Inhibitoren erhalten durften oder bei denen die wiederholten Blutabnahmen nicht möglich gewesen wären. Kinder, welche unter einer angeborenen Gehirnschädigung, die die Sehnervenfunktion beeinträchtigen konnte oder einer schweren Form des Hydrocephalus, welcher zu einem erhöhten intrakraniellen Druck führte, litten, konnten ebenfalls nicht in die Studie eingeschlossen werden. Fortgeschrittene Frühgeborenenretinopathiestadien mit einer teilweisen oder vollständigen Retinaablösung (Stadium 4 oder 5) oder Frühgeborenenretinopathie mit ausschließlich milden Stadien in der

peripheren Zone II oder Zone III waren für die Studie nicht geeignet. Weitere Ausschlusskriterien für die Studie waren bekannte Hypersensitivität gegenüber dem Studienmedikament oder Medikamenten mit ähnlicher chemischer Struktur, Kontraindikation gegen die intravitreale Injektion (laut Fachinformation Lucentis®) (138), sowie eine systemische Anwendung von VEGF-Inhibitoren oder die Anwendung von anderen Medikamenten im Rahmen einer klinischen Studie.

### **4.1.2.4 Behandlungsarme und Verblindung im Rahmen der CARE-ROP Studie**

Im Rahmen der CARE-ROP Studie wurden die Kinder 1:1 auf die zwei Behandlungsarme 0,12 mg und 0,20 mg Ranibizumab randomisiert. Zusätzlich erfolgte eine Stratifizierung der Kinder in zwei Strata mit einem Cutoff bei 25 Wochen Gestationsalter. Um eine Verblindung und damit eine objektive Auswertung aufrechterhalten zu können, wurde in beiden Gruppen das gleiche Volumen (20 µl) appliziert. Hierzu wurden die 6 mg/ml Dosierung von Lucentis®, welche in den USA für die Behandlung eines Diabetischen Makulaödems (DMÖ) zugelassen ist und die in Deutschland zugelassene 10 mg/ml Dosierung eingesetzt. Sollte nach einem initialen Ansprechen auf die Behandlung eine erneute Behandlung nötig werden, konnte, nach mindestens vier Wochen, dieselbe Dosierung des Medikaments erneut injiziert werden. Insgesamt konnten maximal drei Re-Injektionen, für die jeweils dieselbe Frist, wie für die erste Re-Injektion galt, erfolgen. Im Falle einer Re-Injektion wurden die folgenden Nachkontrollen aus Sicherheitsgründen in engeren Abständen terminiert (siehe hierzu auch Abbildung 58 und Abbildung 59 im Anhang).

Die zwei eingesetzten Dosierungen unterschieden sich in der Farbe des Deckels (amerikanisches Lucentis® Vial weißer Deckel, deutsches Lucentis® Vial türkiser Deckel) sowie im Füllvolumen. Aus diesem Grund wurden an jedem Zentrum und bei den beteiligten CROs jeweils ein unverblindetes und ein verblindetes Team gebildet. Um eine Entblindung des verblindeten Studienpersonals durch das Aussehen des Vials bzw. der Verpackung zu vermeiden, wurde das Füllvolumen durch ein Studienetikett verdeckt. Das unverblindete Team am Zentrum war für die Randomisierung über eine Online-Applikation sowie die Medikamentenvorbereitung verantwortlich. Dabei entfernte eine unverblindete Person die farbigen Deckel, bevor sie die Lucentis® Vials dem Injekteur anreichte, sodass für den verblindeten Arzt die Dosierung nicht mehr zu erkennen war. Zur Veranschaulichung ist das Verfahren der Verblindung in der CARE-ROP Studie in Abbildung 32 graphisch dargestellt.



**Abbildung 32:** Schematische Darstellung der Verblindung in der CARE-ROP Studie. Das Studienlabel verdeckte die unterschiedliche Füllhöhe des Medikaments. Die entblindete Study Nurse entfernte den farbigen Deckel, sodass für den verblindeten Injekteur die Dosierung nicht zu erkennen war.

#### 4.1.2.5 Visitenablauf der Kernstudie

Die CARE-ROP Studie wurde als zweiteilige Studie konzipiert: eine 24-wöchige Kernstudie gefolgt von einem 5-Jahres Follow-Up Zeitraum. Nach Aufklärung der gesetzlichen Vertreter über die Teilnahme an der klinischen Studie wurde im Rahmen der Screening-Visite überprüft, ob alle Einschlusskriterien und keines der Ausschlusskriterien erfüllt wurden (siehe hierzu auch 4.1.2.3), sowie die Patientenanamnese dokumentiert.

Die Injektion erfolgte an der Baselinevisite. Während der Vorbereitung aller benötigten Utensilien und der Injektion wurden aseptische Bedingungen eingehalten. Laut Studienprotokoll konnte die Injektion in Vollnarkose oder Sedierung, sowie unter Lokalanästhesie durchgeführt werden. Die Entscheidung darüber lag beim behandelnden Neonatologen in Absprache mit dem Ophthalmologen und wurde in Abhängigkeit vom Zustand des Kindes getroffen. Das genaue Vorgehen bei der Injektion war in einem Injektionsmanual, welches den Zentren zur Verfügung gestellt wurde, dargestellt. Zusammengefasst: Verwendung von betäubenden und desinfizierenden Augentropfen, ein Vial Lucentis® pro Auge, Filtern beim Aufziehen in die Spritze, Injektion von 20 µl im Abstand von 1,5 mm zum Limbus. Der Einsatz von antibiotischen Augentropfen war dem Zentrum freigestellt.

Während der weiteren Studie wurden die Augen (Vorderabschnitt und Retina) regelmäßig genauestens untersucht, außerdem wurden Vitalzeichen, die Entwicklung des Kindes (Gewicht, Größe, etc.), sowie die Ko-Medikation und die Anwendung von Sauerstoff dokumentiert. Die Visitenhäufigkeit wurde, je weiter

## Klinische Aspekte

die Injektion zurück lag, immer geringer. Falls eine Re-Injektion oder eine Rescue-Behandlung notwendig war, wurde der Visitenplan angepasst, sodass die Visiten wieder in der anfänglichen Häufigkeit erfolgten.

Für die Untersuchung der Auswirkung der intravitrealen Injektion auf die systemischen VEGF-Spiegel wurden regelmäßig Blutproben (mind. 200 µl Blut) abgenommen: Während der Baselinevisite (vor der Injektion) zur Messung des Basal-VEGF-Spiegels, eine, drei und fünf Wochen nach der Injektion zur Kontrolle des Verlaufs. Auf freiwilliger Basis konnten, je nach Allgemeinzustand des Kindes, in Woche zwei, vier und sechs noch zusätzliche Blutproben abgenommen werden.

Die Dokumentation der Erkrankung und des Verlaufs erfolgte in den CARE-ROP Dokumentationsbögen (Case Report Form (CRF)), sowie mit einer RetCam (Clarity Medical Systems, Inc., Pleasanton, USA) vor der Injektion, eine Woche und ein Monat nach der Injektion, sowie am Ende der Kernstudie. Bei der RetCam handelt es sich um eine Kamera, mit der die Netzhaut von Kindern und auch von Frühgeborenen untersucht und mit Bildern dokumentiert werden kann. Im RetCam Manual, welches den Zentren im Investigator Folder zur Verfügung gestellt wurde, war genau beschrieben, welche Anzahl und Art von Bildern aufgenommen werden sollte.

Abbildung 58 und Abbildung 59 im Anhang stellen den Visitenplan mit allen Untersuchungen, sowie die Visitenübersicht im Falle einer Re-Injektion oder Rescue-Behandlung dar.

Der primäre Endpunkt wurde am Ende der Kernstudie 24 Wochen nach der ersten Injektion bestimmt. Falls erst kurz vor Ende der Kernstudienzeit eine Re-Injektion oder eine Rescue-Behandlung erfolgte, wurden die Kinder noch mindestens vier Wochen nachkontrolliert.

### 4.1.2.6 Visitenablauf-Follow-Up

Für den Follow-Up Zeitraum wurden vier weitere ophthalmologische und pädiatrische Nachkontrollen geplant: ein Jahr (ophthalmologisch), zwei Jahre (pädiatrisch) und fünf Jahre (ophthalmologisch und pädiatrisch) nach der ersten Injektion. Bei der Follow-Up Visite ein Jahr nach der ersten Injektion (also ein halbes Jahr nach Ende der Kernstudie) findet eine ophthalmologische Untersuchung statt. Im Alter von ungefähr zwei Jahren sollen in Deutschland alle Frühgeborenen an dem Zentrum, an dem sie neonatologisch betreut wurden, mit Hilfe des Bayley Tests untersucht werden. Bei diesem Test wird die motorische und geistige Entwicklung des Kindes überprüft. Die Ergebnisse des Bayley Tests, sowie ob eine Zerebralparese, Taubheit oder Blindheit vorliegt, werden im CRF dokumentiert. Die 5-Jahres Nachkontrolle ist zweigeteilt: bei der ophthalmologischen Untersuchung werden unter anderem der

Visus, die Refraktion, sowie der Intraokulardruck gemessen, die pädiatrische Untersuchung ist in Kooperation mit dem German Neonatal Network (GNN) geplant. Hierbei soll ein geschultes Team des GNN an ein nahegelegenes Studienzentrum kommen und die Untersuchung standardisiert durchführen. Dadurch werden die CARE-ROP Studienkinder vergleichbar mit dem großen Kollektiv des GNN.

Eine Übersicht über den Ablauf des Follow-Up Zeitraums ist im Anhang in Abbildung 60 zu finden.

#### **4.1.2.7 Data Safety Monitoring Board und Reading Center**

Die CARE-ROP Studie ist die erste randomisierte, kontrollierte klinische Studie, in der Ranibizumab bei Frühgeborenen eingesetzt wird. Aus diesem Grund wurde ein Data Safety Monitoring Board etabliert, welches zwei Aufgaben übernahm: Zum Einen fungierte es als „Reading Center“, welches innerhalb von zehn Tagen nach Einschluss des Kindes anhand der RetCam Bilder überprüfte, ob das Kind tatsächlich den Einschlusskriterien entsprach und keine Ausschlusskriterien erfüllt waren. In der zweiten Funktion überwachte es die Kernstudie kontinuierlich und hätte gegebenenfalls auch zu einer Unterbrechung oder einem Abbruch der Studie oder eines Studienarmes raten können. Die DSMB Mitglieder erhielten regelmäßig alle Meldungen zu schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (SUE) und überprüften diese auf einen potentiellen Zusammenhang mit der intravitrealen Injektion von Ranibizumab oder auf eine Häufung bestimmter SUEs. Nach zehn Patienten, die die Kernstudie abgeschlossen hatten, erfolgte eine Überprüfung der Sicherheitsdaten durch das DSMB. Falls es hier zu Auffälligkeiten gekommen wäre, hätte das DSMB den Abbruch der Studie oder eines Behandlungsarmes veranlassen können. Im Prüfplan war vorgesehen, dass eine Häufung von Rescue-Fällen (mind. drei Rescue-Fälle in einem Behandlungsarm) zu einem vorgezogenen DSMB Treffen geführt hätte. Dies war jedoch nicht notwendig. Eine weitere Überprüfung der Sicherheitsdaten durch das DSMB war im Prüfplan optional nach 20 Patienten vorgesehen, in Abhängigkeit von der Datenlage zum Zeitpunkt des ersten DSMB Treffens. In der DSMB Charter waren die genauen Aufgaben und Kriterien für einen Studienabbruch etc. festgelegt.

#### **4.1.2.8 Besonderheit klinische Studie bei Frühgeborenen**

Nach §3 Abschnitt 8 GCP-Verordnung ist ein schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SUE) definiert als „jedes unerwünschte Ereignis oder jede Nebenwirkung, das oder die tödlich oder lebensbedrohend ist, eine stationäre Behandlung oder deren Verlängerung erforderlich macht oder zu bleibender oder schwerwiegender Behinderung oder Invalidität führt oder eine kongenitale Anomalie oder einen Geburtsfehler zur Folge hat“ (270). Nach §12 Abschnitt 4 GCP-V muss der Sponsor vom Prüfer

## Klinische Aspekte

unverzüglich informiert werden, falls ein derartiges Ereignis auftritt. Allerdings können bestimmte Ereignisse von dieser Meldepflicht ausgenommen werden, wenn diese im Prüfplan definiert und von der Ethikkommission und der zuständigen Behörde akzeptiert werden.

Da die Studienpopulation in der CARE-ROP Studie hauptsächlich aus sehr früh geborenen Frühchen bestand, waren bestimmte Erkrankungen und Komplikationen, welche die Definition eines SUEs erfüllen, auch ohne eine studienbedingte Intervention zu erwarten. Deshalb wurden, auf Basis der oben genannten Gesetzesgrundlage, im Rahmen eines Amendments des Prüfprotokolls einige Erkrankungen und Komplikationen definiert (z.B. Krankenhausaufenthalt im Rahmen einer Wiederbehandlung, nosokomiale Infektionen oder nekrotisierende Enterokolitis; eine vollständige Auflistung befindet sich im Anhang in Tabelle 32), welche, abgesehen von Todesfällen, nicht mehr als SUE gemeldet werden mussten, sondern nur im CRF dokumentiert wurden, da ihr Vorkommen bei Frühgeborenen insgesamt sehr häufig und daher mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist. Alle anderen SUEs mussten weiterhin unverzüglich an den Sponsor gemeldet werden.

### **4.1.2.9 Qualitätsprobleme der „Low Volume Syringe“ und resultierende Studienunterbrechung**

In beiden Behandlungsarmen wurden 20 µl der jeweiligen Dosierung appliziert. Um dieses geringe Volumen möglichst genau verabreichen zu können, wurde in der CARE-ROP Studie anfangs eine „Low Volume Syringe“ (eine speziell für die Applikation von Volumina bis zu 200 µl von der Firma Alcon produzierte Spritze) eingesetzt. Bei einer Qualitätskontrolle der Firma Alcon im Februar 2015 fielen Kontaminationen (Fasern) auf, die in einigen der getesteten Spritzen (Lot Nr.: P1561004H) gefunden wurden. Da dieselbe Charge auch in der CARE-ROP Studie zum Einsatz gekommen war, wurden sofort nach Bekanntwerden des Qualitätsproblems die Rekrutierung und alle weiteren Injektionen (Re-Injektionen, Rescue-Injektionen) zum 06.02.2015 unterbrochen.

Eine neue Produktion der „Low Volume Syringe“ hätte beträchtliche Zeit in Anspruch genommen, weswegen die Studie zum 10.03.2015 unter Einsatz der auch bei Erwachsenen für die Applikation von Lucentis® eingesetzten Spritzen mit Genehmigung der federführenden Ethikkommission und des Paul-EhrlichInstituts wieder fortgeführt wurde. Diese Spritze wurde auch vor Beginn der CARE-ROP Studie bereits off-label zur Applikation von Bevacizumab und Ranibizumab bei Frühgeborenen verwendet. Dennoch muss bedacht werden, dass die Spritze nicht ideal für die Applikation dieser geringen Volumina geeignet ist - das Maximalvolumen der Spritze beträgt 1 ml und Dosisschwankungen bei der Applikation



der geringen Volumina können nicht ausgeschlossen werden. Besonders bei der Einschätzung der Wirksamkeit muss beachtet werden, dass die Dosiergenauigkeit durch den Einsatz der normalen Lucentis® Spritze möglicherweise niedriger ist, als bei Verwendung der kleinen Spritze.

#### **4.1.3 VEGF-A-Messmethodik**

Der Wachstumsfaktor VEGF-A hat besonders im noch stark wachsenden Organismus eines Frühgeborenen eine wichtige Rolle. Sowohl bei Erwachsenen als auch bei Frühgeborenen ist bekannt, dass eine intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren zum Absinken der systemischen VEGF-Spiegel führen kann (94, 95), wobei die Relevanz dieser systemischen Beeinflussung noch diskutiert wird. Einer der Kritikpunkte an der 2011 publizierte BEAT-ROP Studie ist das Versäumnis, den Einfluss der Bevacizumab Behandlung und der Laserkoagulation auf diese Spiegel zu untersuchen (97).

In der Literatur sind für die VEGF-A-Messung eine Vielzahl verschiedener Methoden in Bezug auf Probensammlung (Kanüle (271), Verwendung von Serum vs. Plasma (272-275), Antikoagulans (95, 273, 276, 277)) sowie der prä-analytischen Aufbereitung der Proben (Zentrifugation, Kühlung (278)) und der Messmethodik an sich (ELISA (274, 279, 280)/Luminex (74, 281)) zu finden. Dadurch ist es kaum möglich Daten aus verschiedenen Studien zu vergleichen. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurde vor Start der CARE-ROP Studie ein Ringversuch durchgeführt, in dem verschiedene Parameter, die möglicherweise einen Einfluss auf die VEGF-A-Messung haben könnten, an gesunden erwachsenen Probanden an mehreren Zentren parallel untersucht wurden. Für die CARE-ROP Studie wurden die Parameter, die in dieser Studie einen Einfluss auf die VEGF-Spiegel hatten, mit Hilfe eines Labormanuals standardisiert.

##### **4.1.3.1 Verwendete Materialien**

Im folgenden Abschnitt sind die im klinischen Teil dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen Chemikalien (Tabelle 18), Verbrauchsmittel (Tabelle 19), Geräte und Kits (Tabelle 20) sowie das selbst hergestellte Antikoagulans PECT (Tabelle 22) zusammengestellt. Das VEGF-Messmethodikprojekt wurde als Ringversuch durchgeführt, weshalb nicht alle Versuche in Freiburg stattfanden. Für alle Zentren wurden dieselben Chargen der Kits eingesetzt, des Weiteren wurden alle Blutentnahmeröhrchen und Kryogefäße in Freiburg vorbereitet und an die teilnehmenden Zentren verschickt.

## Klinische Aspekte

**Tabelle 18:** Liste der im klinischen Teil verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Katalognummer	Firma
Humanes Rekombinantes VEGF	293-VE-010	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Prostaglandin E <sub>1</sub>	P5515-1mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
EDTA	ED2P-100g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Sodium-Carbonat	S7795-500g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Theophyllin	T1633-50g	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE

**Tabelle 19:** Liste der im klinischen Teil verwendeten Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Katalognummer	Firma
21G Butterfly Kanüle	85.1638.205	Sarstedt, Nürnberg, DE
23G Neonatalkanüle	85.923	Sarstedt, Nürnberg, DE
Microvette® 500 K3E	20.1341	Sarstedt, Nürnberg, DE
S-Monovette® 9ml K3E	02.1066.001	Sarstedt, Nürnberg, DE
S-Monovette® 2,9ml CTAD	04.1909.001	Sarstedt, Nürnberg, DE
Reaktionsgefäße 0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	72.699 72.700 72.695.400	Sarstedt, Nürnberg, DE

**Tabelle 20:** Liste der im klinischen Teil verwendeten Geräte und Kits

Geräte/Kits	Katalognummer	Firma
ELISA Kit (VEGF-A)	DVE00	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Human VEGF HS Magnetic Luminex Performance Assay	LHSCM293	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Human CXCL4/PF4 Quantikine ELISA Kit	DPF40	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Human IGF-1 Quantikine ELISA Kit	DG100	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Microplate Reader	GENios	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Zentrifuge	Heraeus Multifuge® 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 21:** Liste der im klinischen Teil verwendeten Programme

Programm	Version	Firma
Excel	Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
Excel Add-in X-Fluor 4 <sup>TM</sup>	Microsoft Excel 2010	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
GraphPad Prism	Version 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, Californien, USA
R	Aktuelle Version (2014/2015)	R Foundation, Wien, AUT

**Tabelle 22:** Verwendetes Antikoagulans

Lösung	Herstellung
PECT Antikoagulans	<p>1 mg Prostaglandin E<sub>1</sub> in 10 ml Ethanol auflösen.</p> <p>1,34 mg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 36,03 mg Theophyllin in 20 ml demin. H<sub>2</sub>O lösen. 728 mg EDTA und 6,67 µl Prostaglandin Lösung (0,666 µg Prostaglandin E<sub>1</sub>) dazu geben.</p> <p>Da Microvetten® käuflich nicht leer erworben werden können, wurden EDTA-Microvetten® mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O ausgewaschen und dann 50 µl PECT Antikoagulans (auf ein maximales Füllvolumen von 500 µl Vollblut) in den Microvetten® vorgelegt.</p>

#### 4.1.3.2 Aufbau des Projekts

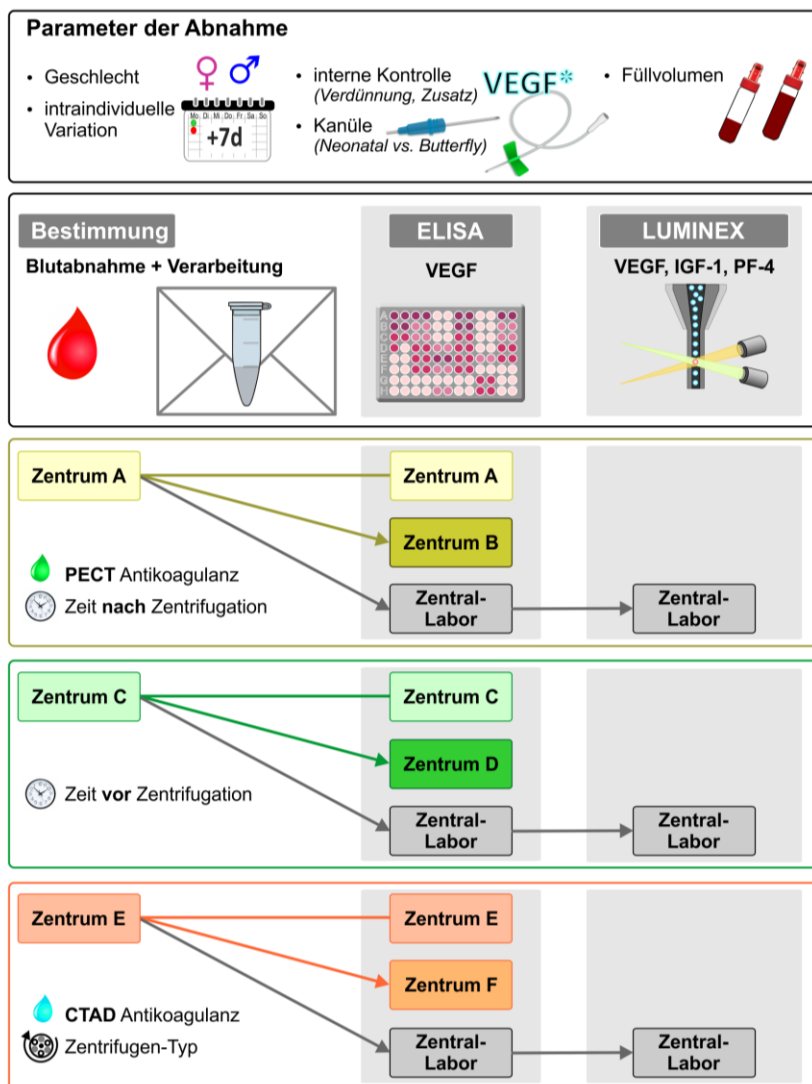
Das VEGF-A-Messmethodik Projekt wurde als Ringversuch durchgeführt. Sämtliche Projektvorbereitungen sowie die ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Messungen der Blutproben des Zentrums Freiburg erfolgten durch die Autorin dieser Dissertation, während die übrigen Messungen an anderen Zentren vor Ort und die Blutabnahmen durch Ärzte der jeweiligen Augenkliniken durchgeführt wurden.

Insgesamt waren sieben Zentren (die Augenkliniken Freiburg, Bonn, Tübingen, Ulm, Kiel und Münster, sowie das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut (NMI) Reutlingen als Zentrallabor) beteiligt. Die Zentren Freiburg, Bonn und Tübingen waren Entnahmezentren, welche für die Blutentnahmen, sowie die weiteren prä-analytischen Schritte bis zur Aliquotierung des Blutplasmas zuständig waren und einen Teil der Plasmaaliquots selbst vermessen haben. Ulm, Kiel und Münster waren weitere Messzentren, an denen die VEGF-A-Spiegel der Aliquots derselben Blutproben mittels ELISA gemessen wurden. Als Zentrallabor fungierte das NMI Reutlingen. Hier wurden die VEGF-A-Spiegel mittels ELISA und Luminex gemessen. Zusätzlich erfolgte dort noch die Bestimmung der Thrombozytenaktivierung

## Klinische Aspekte

durch Messung der PF-4-Spiegel (Platelet Factor-4), sowie die Messung der Konzentration des Wachstumsfaktors IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1) mittels ELISA.

Jeweils ein Entnahmezentrum und ein Messzentrum haben Aliquots derselben Proben vermessen. Ein weiteres Aliquot wurde vom Zentrallabor mittels ELISA und Luminex vermessen, sodass die VEGF-A-Spiegel in jeder Probe dreimal mittels ELISA und einmal mittels Luminex gemessen wurden. Eine Übersicht über den Aufbau des Ringversuchs ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Übersicht über den Ringversuch zur VEGF-A-Messmethodik. Jeweils zwei Zentren bildeten ein Messpaar und haben in denselben Proben VEGF-A mittels ELISA gemessen. Zusätzlich wurden in allen Proben vom Zentrallabor VEGF-A mittels ELISA und Luminex gemessen. Die untersuchten Parameter waren neben der Schwankung der Messwerte durch Messung an unterschiedlichen Zentren: Geschlecht, intraindividuelle Variation innerhalb einer Woche, Füllvolumen der Röhrchen, Antikoagulantien (EDTA, PECT und CTAD), Zeit vor/nach Zentrifugation und Zentrifugen-Typ. Zusätzlich wurden am Zentrallabor noch IGF-1 und PF-4 bestimmt.

#### 4.1.3.3 Untersuchte Parameter

Aus der Literatur ist bekannt, dass sehr viele Parameter Einfluss auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel haben können. Um dieser Tatsache gerecht zu werden, wurden bestimmte Parameter, die in diesem Projekt nicht betrachtet werden sollten, möglichst exakt zwischen den Entnahmezentren standardisiert, sodass nur noch die Parameter, welche zur Untersuchung standen, variiert wurden: An den Entnahmezentren wurde initial Blut von je einem freiwilligen gesunden männlichen und weiblichen Probanden im Alter zwischen 20 und 40 Jahren im Liegen entnommen und die Blutentnahme nach einer Woche wiederholt. Acht weiteren Probanden (vier Männer, vier Frauen) wurde für zusätzliche Experimente zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal Blut abgenommen. Die Entnahme erfolgte morgens (zwischen 7:30 und 10 Uhr) nüchtern, wobei die letzte Mahlzeit am Vorabend vor 24 Uhr eingenommen werden sollte. Am Tag vor der Entnahme sollte keine außergewöhnliche Belastung (Dauerlauf, exzessiver Sport) stattfinden. Zuerst erfolgte die Blutentnahme bei den männlichen, dann bei den weiblichen Probanden, als Erstes unter Verwendung der Butterflykanülen (zusammen mit S-Monovetten®), dann der Neonatalkanülen (zusammen mit Microvetten®). Zur Vermeidung langer Stauungszeiten wurde die Stauung sofort nach Punktion der Vene wieder aufgehoben und der erste Tropfen (bei der Neonatalkanüle) bzw. der erste Milliliter (bei der Butterflykanüle) verworfen. Der Einfluss der Füllhöhe der Blutsammelgefäße wurde an allen Zentren untersucht, indem je ein Teil der Röhrchen nur zur Hälfte gefüllt wurde. Nachdem das Blut abgenommen war, wurden die Röhrchen dreimal invertiert. An einem Zentrum wurde neben EDTA noch das Antikoagulans PECT untersucht (PECT=Prostaglandin E<sub>1</sub>, EDTA, Natriumcarbonat, Theophyllin; auch bekannt als Edinburgh Antikoagulans. Die Herstellung ist in Tabelle 22 beschrieben; S-Monovetten® und die EDTA-Microvetten® wurden mit destilliertem Wasser ausgewaschen und PECT vorgelegt (S-Monovetten® 900 µl; Microvetten® 50 µl). Ein anderes Zentrum sollte neben EDTA noch CTAD einsetzen (CTAD=Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol; CTAD S-Monovetten® sind kommerziell verfügbar, jedoch keine CTAD Microvetten®; diese wurden durch Vorlage von 50 µl CTAD in ausgewaschenen Microvetten® hergestellt). Weitere Parameter, deren Einfluss an jeweils nur einem Zentrum untersucht wurde, waren: die Zentrifugenart (Festwinkelrotor vs. Ausschwenkrotor), die Wartezeit vor der Zentrifugation (innerhalb von 30 min. vs. 2 h) und die Wartezeit zwischen Zentrifugation und Aliquotieren des Plasmas (bis zu 6 h). Zur Abbildung von Extremwerten in den beiden Messmethoden ELISA und Luminex wurde ein Teil der Proben mit PBS verdünnt, bzw. einem Teil wurde humanes rekombinantes VEGF zugesetzt.

## Klinische Aspekte

Zusammenfassend wurden folgende Parameter auf ihren Einfluss auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel in dieser Studie untersucht: Geschlecht, intrapersonelle Schwankungen über die Zeit (eine Woche), Kanülenart (Neonatalkanüle vs. Butterflykanüle), Füllhöhe, Antikoagulans (EDTA, PECT, CTAD), Zentrifugenart, Wartezeit vor und nach Zentrifugation, die Messmethode und das Messzentrum.

Zusätzlich wurde die Konzentration des Thrombozytenaktivierungsmarkers PF-4 mittels ELISA bestimmt. Damit wurde überprüft, ob ein Anstieg der VEGF-A-Konzentration mit einer Thrombozytenaktivierung einherging. Als zusätzlicher unabhängiger Parameter wurde der Wachstumsfaktor IGF-1 gemessen, um zu sehen, ob die Einflussfaktoren, die für VEGF-A relevant sind, auch für ein anderes, nicht in Thrombozyten gespeichertes Protein eine Rolle spielen.

Eine Übersicht über die untersuchten Parameter an den jeweiligen Zentren ist in Abbildung 33 dargestellt.

### 4.1.3.4 ELISA

Die VEGF-Konzentration wurde im Zentrallabor sowie an allen Mess- und Entnahmezentren mit der ELISA-Methode (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay), die auf einer Sandwich-Reaktion beruht, quantitativ bestimmt. Dabei ist ein monoklonaler Antikörper (primärer Antikörper) an der festen Phase (die Wells einer 96-Well Platte) fixiert, und bindet das in den Standards (verschiedene Konzentrationen, zur Erstellung einer Standardkurve), sowie den Proben enthaltene VEGF. Nach 2 h Inkubation wird der Überschuss im folgenden Waschschrift entfernt. Danach erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers, der durch Bindung an VEGF einen Sandwich-Komplex bildet. An diesen Antikörper ist zusätzlich das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert nach Zugabe von Wasserstoffperoxid die Umsetzung des Chromogens Tetramethylbenzidin. Die dabei zu beobachtende Farbentwicklung ist proportional zur ursprünglich gebundenen VEGF-Menge. Zugabe von Schwefelsäure stoppt die Farbreaktion und die entwickelte Farbintensität wird als Absorption bei 450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 570 nm, an einem Photometer gemessen.

Die Durchführung des VEGF-A ELISAs erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers, in Freiburg unter Verwendung des Photometers GENios (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH).

Die Bestimmung der PF-4 und IGF-1 Konzentrationen erfolgte am Zentrallabor ebenfalls mit Hilfe einer ELISA-Sandwichreaktion gemäß den Angaben des Herstellers der jeweiligen ELISA-Kits. Die Methodik ist analog zur Bestimmung von VEGF-A zu sehen.

#### 4.1.3.5 Luminex

Am Zentrallabor (NMI Reutlingen) wurde die VEGF-A-Konzentration neben ELISA zusätzlich mit der Luminex Methode bestimmt. Auch dieses Verfahren beruht auf einer Sandwichreaktion, ähnlich zu der für ELISA (siehe auch Abschnitt 4.1.3.4). Dabei ist ein Antikörper, welcher spezifisch gegen den Analyten (hier humanes VEGF-A) gerichtet ist, an magnetische, farbcodierte Mikropartikel, sogenannte Beads gebunden. Diese Beads sind in der Mikroplatte über einen Magneten fixiert und binden den Analyten im Standard und den Proben. Nach einem Waschschriff (Entfernung des ungebundenen Analyt) wird ein biotinylierter Antikörper zugegeben, der spezifisch an humanes VEGF bindet und somit ein Antikörper-Analyt-Sandwich bildet. Es folgen ein erneuter Waschschriff und die Zugabe eines Streptavidin-Phycoerythrin Konjugats (Streptavidin-PE), welches an den biotinylierten Antikörper bindet. Im letzten Waschschriff wird nicht gebundenes Konjugat wieder abgewaschen. Bei der Analyse hält ein Magnet die Beads in einem Monolayer, während zwei LEDs (Light emitting diode) mit den Wellenlängen 511 nm und 621 nm auf die Beads einstrahlen. Die eine LED erkennt den gebundenen Analyten aufgrund der Färbung des Beads, die andere LED detektiert die Stärke des PE-Signals. Eine CCD (Charge coupled device, Dt. ladungsgekoppeltes Bauteil) Kamera nimmt jedes Well einzeln auf.

In Reutlingen wurde zur Auswertung der Intensität des PE-Signals ein Luminex MAGPIX Analyzer verwendet. Die Bestimmung der VEGF-A-Konzentration mittels Luminex-Verfahren erfolgte analog der Angaben des Herstellers. Mit der Luminex-Methode kann nicht nur ein Analyt, sondern mehrere Proteine gleichzeitig quantitativ nachgewiesen werden. Im Rahmen des VEGF-Ringversuchs wurde jedoch nur die Konzentration von humanem VEGF-A bestimmt und somit dieser Vorteil der Luminex-Methode nicht ausgenutzt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die geringere Menge an Probenvolumen, was besonders für die Proben aus der CARE-ROP Studie interessant sein könnte. Außerdem ist die minimal zu bestimmende Konzentration für VEGF-A mit 1,74 pg/ml angegeben, also deutlich niedriger, als in der ELISA Methode (9,0 pg/ml).

#### 4.1.3.6 Statistische Analyse

Ein lineares Regressionsmodell unter Verwendung multipler Regressionsanalysen (Unterstützung dabei durch Prof. Dr. Daniel Böhringer, Universitätsaugenklinik Freiburg mit der Statistiksoftware R, R Foundation, Wien, AUT) wurde eingesetzt, um die Parameter auf ihren unabhängigen Einfluss auf die VEGF-A-Plasmaspiegel hin zu untersuchen. Statistisch signifikante Unterschiede sind folgendermaßen markiert: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , ns: nicht statistisch signifikant. Um den Einfluss auf die

## Klinische Aspekte

mittleren VEGF-A-Spiegel und die Schwankungen der Messwerte besser zu visualisieren, wurden einige Parameter noch zusätzlich deskriptiv untersucht. Mit Graphpad Prism (V.5, GraphPad Software, Inc., La Jolla, Californien, USA) wurden dabei der Spearman's Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) in einer gepaarten Analyse (wenn geeignet) berechnet bzw. die Daten als Tukey Boxplots (Ausreißer, welche außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand liegen, werden durch Kreise symbolisiert) und Balkendiagramme mit Standardabweichung dargestellt.

An manchen Zentren waren bestimmte, eigentlich vorgesehene Blutproben nicht abgenommen worden, bzw. nur in zu geringer Menge, sodass einzelne Aliquots nicht existierten. Diese Proben wurden bei der gepaarten Analyse weggelassen und sie wurden aus dem linearen Regressionsmodell ausgeschlossen. Insgesamt handelte es sich dabei um sechs von 404 Aliquots. Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen (vom Hersteller für jeden Assay als „minimal detectable dose“ (kleinste bestimmbare Konzentration; MDD) angegeben), wurden durch die Hälfte der MDD ersetzt. Für den VEGF-A ELISA Assay lag die MDD bei 9 pg/ml, für den VEGF-A Luminex Assay bei 1,74 pg/ml, für den IGF-1 ELISA bei 22,4 ng/ml und für den PF-4 ELISA bei 4,63 pg/ml.

## 4.2 Ergebnisse

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des klinischen Teils dieser Arbeit gegliedert nach den drei Projekten dargestellt:

- Ergebnisse aus dem Frühgeborenenretinopathie Register
- Verblindete Ergebnisse der Safety-Zwischenauswertung der ersten 13 Patienten aus der CARE-ROP Studie
- Ergebnisse aus dem VEGF-A-Messmethodikprojekt

Die Daten aus dem Frühgeborenenretinopathie Register sind in der Publikation Walz *et al.* „The German ROP Registry: data from 90 infants treated for retinopathy of prematurity“ (47) bzw. dem Abstract Walz *et al.* „The German ROP Registry: Association of demographic factors and the requirement for re-treatments of retinopathy of prematurity“ (ARVO, Seattle, 2016) und dem Abstract Walz *et al.* „Retina.net ROP Register: Überprüfung des Zusammenhangs demographischer Faktoren mit dem Bedarf für Re-Injektionen“ (DOG, Berlin, 2016) bereits veröffentlicht worden. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation lagen die verblindeten Ergebnissen aus der CARE-ROP Studie vor, auf deren Basis das DSMB die Entscheidung zum Fortführen der Studie ohne Änderungen am Studienprotokoll am



09.03.2016 getroffen hat. Bei Einreichung dieser Dissertation ist die Vollpublikation zur CARE-ROP Studie Stahl *et al.* „Comparing alternative ranibizumab dosages for safety and efficacy in ROP (CARE-ROP): a randomized clinical trial“ bei JAMA Paediatrics angenommen (76). Die Ergebnisse aus dem VEGF-A-Messmethodikprojekt wurden in der Publikation Walz *et al.* „Pre-Analytical Parameters Affecting Vascular Endothelial Growth Factor Measurement in Plasma: Identifying Confounders“ (282), sowie dem Abstract Walz *et al.* „Pre-analytical parameters have significant impacts on VEGF levels measured from human plasma“ (ARVO, Denver, 2015) und dem Abstract Walz *et al.* „Pre-analytical parameters affecting VEGF measurements from human plasma“ (6<sup>th</sup> international Symposium on AMD, Baden-Baden, 2015) publiziert.

#### **4.2.1 Frühgeborenenretinopathie Register**

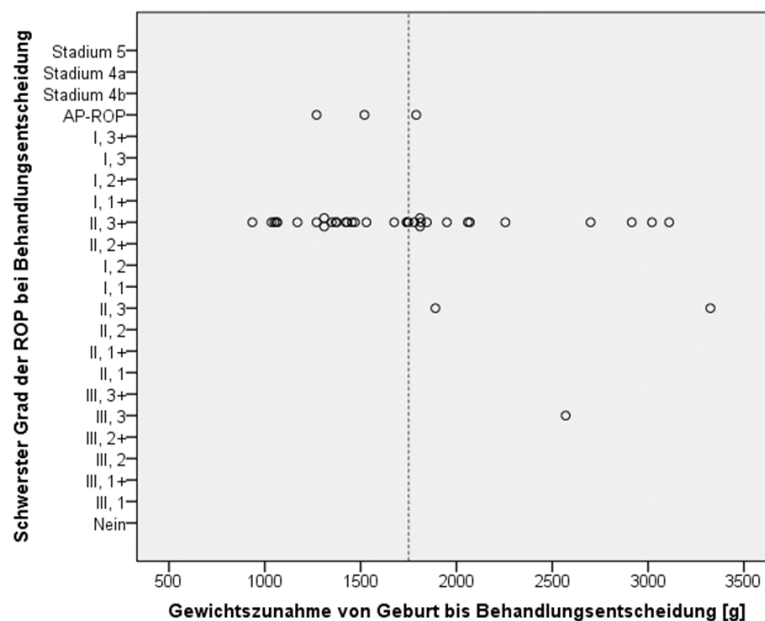
Für die vorliegende Auswertung wurden Daten von 90 Kindern aus insgesamt neun teilnehmenden Zentren, welche zwischen 2011 und 2013 geboren wurden, verwendet. Die Frühgeborenenretinopathie Behandlung fand naturgemäß für 2013 geborene Kinder teilweise erst in 2014 statt, daher sind im Folgenden auch Werte zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie aus 2014 abgebildet. Queries (z.B. bei fehlenden oder offensichtlich falsch eingegebenen Daten) wurden manuell gestellt und von den Zentren, gemäß der ihnen vorliegenden Daten, beantwortet.

##### **4.2.1.1 Patientenkohorte**

Die 90 Kinder verteilten sich, abgesehen von einer Ausnahme (ein Zentrum hat im beschriebenen Zeitraum nur ein Kind in das Register eingetragen), ungefähr gleichmäßig auf die anderen acht Zentren. 50 der behandelten Frühgeborenenretinopathie Fälle waren initial im eigenen Krankenhaus neonatologisch versorgt worden, 40 Kinder wurden aus externen Häusern für die Behandlung der Frühgeborenenretinopathie an das dokumentierende Zentrum verlegt. Die Patientenkohorte bestand aus 41 männlichen und 49 weiblichen Frühchen. Das mittlere Gestationsalter bei Geburt betrug  $25 \pm 2$  Wochen und reichte von 22 bis 37 Wochen. Das Kind, welches mit einem Gestationsalter bei Geburt von 37 Wochen im Verlauf eine behandlungsbedürftige Frühgeborenenretinopathie entwickelte, fällt natürlich deutlich auf. Laut deutschen Screening Leitlinien (41), müsste dieses Kind (das Geburtsgewicht betrug 1860 g) nicht einmal auf die Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie hin gescreent werden: Die Screening Leitlinien geben vor, dass alle Kinder, die vor 32 Wochen Gestationsalter geboren werden, alle Kinder mit einem Geburtsgewicht unter 1500 g und alle Kinder, die zwischen 32 und 36 Wochen geboren werden und mehr als drei Tage lang eine Sauerstoffsupplementation benötigen, regelmäßig auf

die Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie gescreent werden sollen. Bei dem 37 Wochen alten Kind wurde als zusätzliche Information angegeben, dass es sich um einen hypoplastischen Zwilling handelte. Weitere Informationen lagen nicht vor. Das Geburtsgewicht der Kohorte insgesamt reichte von 340 bis zu 1860 g, wobei es im Mittel bei 690 g ( $\pm 250$ ) lag.

Zum Zeitpunkt der Behandlung waren die Kinder im Schnitt  $37 \pm 3$  Wochen alt (postmenstruelles Alter, PMA; minimales Alter: 32 Wochen, maximales Alter 53 Wochen). Hier fällt besonders das Kind mit 53 Wochen bei Behandlung auf. Dieses Kind war aus der initialen ophthalmologischen Betreuung ausgeschieden und dann erst im Alter von 53 Wochen wieder vorstellig geworden. Bis zum Zeitpunkt der Behandlung hatten die Kinder im Durchschnitt 1751 g ( $\pm 602$ ) (minimal: 935 g, maximal: 3325 g) zugenommen, was einer Gewichtszunahme von etwa 21 g ( $\pm 4$ ) (minimal: 12,6 g, maximal: 30,9 g) pro Tag entspricht und in einem Körpergewicht von 2483 g ( $\pm 700$ ; minimal: 1430 g, maximal: 4100 g) bei Behandlung resultierte. Eine AP-ROP kam häufiger bei Kindern vor, die weniger Gewicht zugenommen haben. Auch sonst war eine Tendenz zu sehen, dass die Kinder mit größerer Gewichtszunahme einen weniger stark ausgeprägten Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie aufwiesen. Beim deutlichen Großteil der Kinder lag eine Zone II, 3+ Erkrankung vor, weshalb nur von einer Tendenz gesprochen werden kann (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Zusammenhang des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie mit der absoluten Gewichtszunahme bis zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung (n=40); es ist eine leichte Tendenz zu erkennen, dass Kinder mit einer höheren Gewichtszunahme weniger starke Ausprägungen der Frühgeborenenretinopathie zeigten.

Zusätzlich zu den im Register dokumentierten Parametern wurde bei den Zentren die Zahl an insgesamt gescreenten Kindern erfragt. Diese Zahl konnte von acht der neun Zentren erhoben werden, an denen sich eine Inzidenzrate der behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie von 3,2 % aller gescreenten Kinder ergab.

#### **4.2.1.2 Relevante Komorbiditäten und Sauerstoffsupplementation**

Die Komorbiditäten und Sauerstoffsupplementation wurden unter dem Punkt neonatologische Parameter im Register dokumentiert. Da an den meisten Zentren die Dokumentation von den Ophthalmologen ausging, waren diese Parameter nicht an allen Zentren vollständig erfasst. Auch auf Nachfrage konnten nicht alle Informationen erhalten werden. Eine fehlende Angabe ist folglich nicht mit der Tatsache gleichzusetzen, dass die Erkrankung bzw. Sauerstoffgabe in diesem Fall nicht vorlag.

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass einige Erkrankungen, wie z.B. Sepsis (283), Gehirnblutungen (283) und Mykose (284, 285) mit dem Auftreten einer schweren Form der Frühgeborenenretinopathie assoziiert sind. Die im Retina.net ROP Register dokumentierten Kinder wurden alle mindestens unilateral behandelt, was per se bedeutet, dass eine schwere Form der Frühgeborenenretinopathie vorlag. Zusätzlich kann innerhalb der Behandlungsbedürftigkeit noch eine Abstufung in weniger schwere (z.B. III 3-; in Tabelle 23 links) und besonders schwere Stadien (AP-ROP, 4a/b, I 3+; in Tabelle 23 rechts) vorgenommen werden. Eine Zusammenfassung der Ko-Erkrankungen, die beim untersuchten Patientenkollektiv vorlagen, ist in Tabelle 23 dargestellt. Eine Sauerstoffsupplementation benötigten fast alle Patienten (69 von 70; 99 %), für die diese Information vorlag, was im Zusammenhang steht mit einer Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD), die bei 55 von 65 Kindern (85 %) dokumentiert wurde und somit die häufigste Komorbidität war. Auch eine bakterielle Sepsis (42 von 70 Fällen) und ein persistierender Ductus Arteriosus (49 von 68 Fällen) lagen relativ häufig vor. Systemische Mykosen, Gehirnblutungen und eine nekrotisierende Enterokolitis traten dagegen im dokumentierten Kollektiv selten auf. Insgesamt wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie und dem Auftreten der Komorbiditäten gesehen.

## Klinische Aspekte

**Tabelle 23:** Vorliegende Sauerstoffsupplementation und Ko-Erkrankungen aufgetrennt nach Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie; n gibt die Anzahl an Kindern an, die den jeweiligen Schweregrad aufwiesen. Da die neonatologischen Parameter partiell nicht dokumentiert wurden, gibt es hier relativ viele fehlende Angaben (k.A. = keine Angabe); Der Großteil der Kinder, bei denen eine Angabe gemacht wurde, erhielten eine Sauerstoffsupplementation, hatten eine BPD, eine bakterielle Sepsis und/oder einen persistierenden Ductus Arteriosus. Systemische Mykosen, Gehirnblutungen und nekrotisierende Enterokolitis traten dagegen nur selten auf.

Schwerster ROP Grad		III, 3-	II, 3-	II, 3+	I, 2+	I, 3+	AP-ROP <sup>a</sup>	4b	Alle Stadien
O <sub>2</sub> / Ko-Erkrankung		n=1	n=3	n=72	n=1	n=5	n=5	n=3	n=90
O <sub>2</sub> Supplementation	vorhanden	1	3	56	-	3	5	1	69
	abwesend	0	0	1	-	-	0	-	1
	k.A.	-	-	15	1	2	-	2	20
BPD <sup>b</sup>	vorhanden	1	1	47	-	3	3	-	55
	abwesend	0	2	7	-	-	1	-	10
	k.A.	-	-	18	1	2	1	3	25
Bakterielle Sepsis	vorhanden	0	2	36	-	1	3	-	42
	abwesend	1	1	21	-	2	2	1	28
	k.A.	-	-	15	1	2	-	2	20
Persistierender Ductus Arteriosus	vorhanden	1	2	39	-	3	3	1	49
	abwesend	0	1	16	-	-	2	-	19
	k.A.	-	-	17	1	2	-	2	22
Systemische Mykose	vorhanden	0	0	10	-	-	1	1	12
	abwesend	1	3	45	-	3	4	-	56
	k.A.	-	-	17	1	2	-	2	22
Gehirnblutung	vorhanden	0	2	22	-	2	2	1	29
	abwesend	1	1	34	-	1	3	-	40
	k.A.	-	-	16	1	2	-	2	21
NEK <sup>c</sup>	vorhanden	0	0	7	-	1	1	-	9
	abwesend	1	3	48	-	2	4	1	59
	k.A.	-	-	17	1	2	-	2	22

a: AP-ROP = Aggressive posteriore ROP, besonders schwere und rasch fortschreitende Form der Frühgeborenenretinopathie; je weiter rechts in der Tabelle eine Form der Frühgeborenenretinopathie steht, desto schwerer ist diese Form;

b: BPD = Bronchopulmonale Dysplasie; c: NEK = Nekrotisierende Enterokolitis.

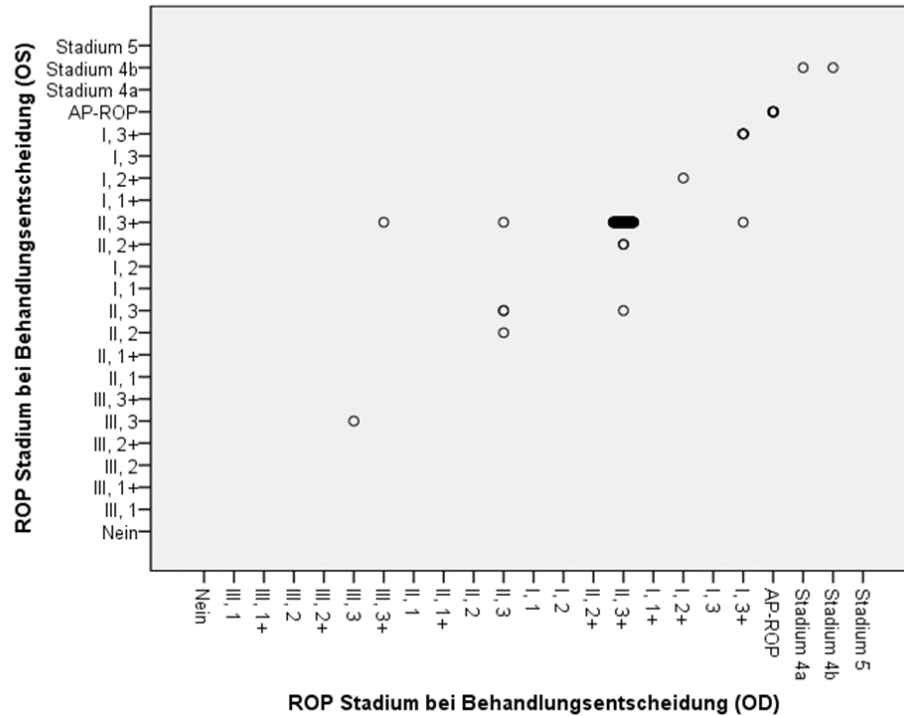
### 4.2.1.3 Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung

Laut den deutschen Leitlinien zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie soll jedes Auge, welches in Zone I (definiert als Kreis um den Sehnerv mit einem Radius von doppeltem Abstand Papille-Fovea) eine Frühgeborenenretinopathie jeden Stadiums mit „plus disease“ oder ein Stadium 3 auch ohne plus

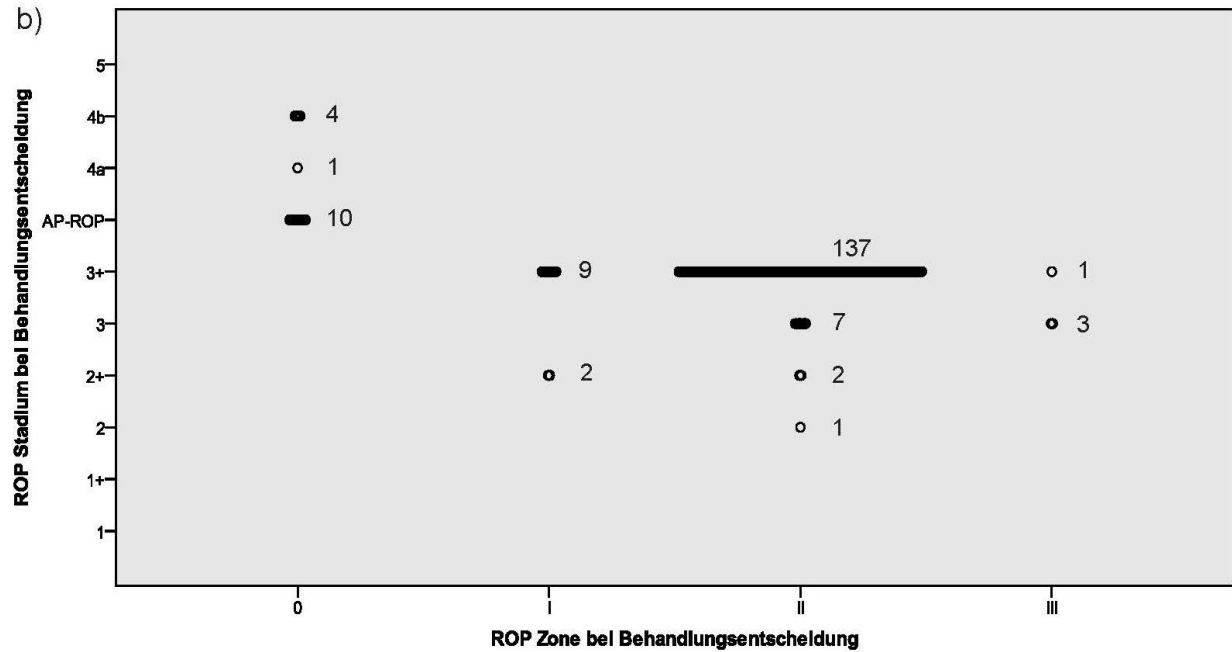
disease aufweist, behandelt werden. In Zone II (Kreis um die Papille mit Radius Papille-Ora serrata auf nasaler Seite) soll ein Stadium 3+ mit extraretinalen Proliferationen über mind. 5 zusammenhängende oder 8 unzusammenhängende Uhrzeiten behandelt werden. Eine Erkrankung in Zone III (temporaler Rest der Retina) ist normalerweise nicht behandlungsbedürftig (84).

Bei den Kindern, die im Register dokumentiert wurden, lag zum Zeitpunkt der Entscheidung für eine Behandlung bei nur sechs Kindern (11 Augen) eine Zone I Erkrankung vor, beim Großteil der Kinder (75 Kinder/147 Augen) wurde aufgrund einer Zone II Erkrankung die Entscheidung für eine Behandlung getroffen. Vier Augen wurden aufgrund einer Zone III Erkrankung behandelt. In fünf Augen (vier Kinder) lag ein Stadium 2 vor, in 157 Augen (82 Kinder) ein Stadium 3, ein Auge wurde als 4a und vier Augen (drei Kinder) als 4b eingestuft. Die besonders schnell voranschreitende und damit äußerst gefährliche AP-ROP lag bei fünf Kindern bilateral vor. Die insgesamt am häufigsten vorkommende Ausprägung der Frühgeborenenretinopathie war eine Zone II, 3+ Erkrankung (137 Augen). Der Schweregrad beider Augen war in den meisten Fällen vergleichbar (siehe Abbildung 35a). Abbildung 35b zeigt eine Übersicht über alle zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung vorliegenden Zonen- und Stadien-Kombinationen, die im Register dokumentiert wurden.

a)

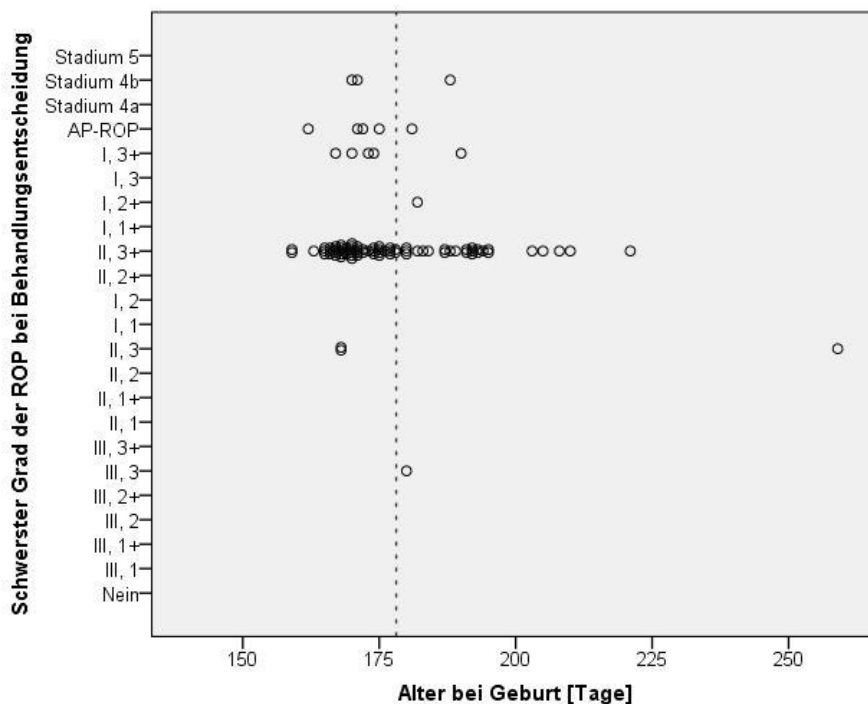


b)



**Abbildung 35:** Zusammenstellung des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie; a) Stadium der Frühgeborenenretinopathie im rechten (X-Achse) und linken Auge (Y-Achse) zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung. Meist liegt bilateral dasselbe Stadium vor; b) Übersicht über die Zonen (X-Achse) und Stadien (Y-Achse), welche bei Behandlungsentscheidung vorlagen. Die neben den Kreisen stehenden Zahlen geben die Häufigkeit der jeweiligen Zone/Stadium Kombination an.

Bei Betrachtung des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie, in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Geburt (siehe Abbildung 36), sieht man, dass die besonders schweren Fälle (AP-ROP; 4a, 4b, 5, Zone I Erkrankungen) eher ein geringeres Alter bei Geburt aufwiesen. Kinder mit einer Zone I Erkrankung waren bei Geburt im Durchschnitt  $24,7 \pm 1,5$  Wochen alt, Kinder mit einer Zone II Erkrankung im Durchschnitt  $25,1 \pm 2,3$  Wochen. Ab einem Gestationsalter von mindestens 200 Tagen ( $\geq 28$  (+4) Wochen) war der höchste Schweregrad eine Zone II, 3+ Erkrankung. AP-ROP kam nur bei Kindern vor, die mit maximal 181 Tagen (= 25 (+6) Wochen) Gestationsalter zur Welt kamen, Stadium 4 kam nur bis 188 Tage (= 26 (+6) Wochen) vor.



**Abbildung 36:** Der schwerste vorliegende Grad der Frühgeborenenretinopathie in Abhängigkeit vom Alter bei Geburt [Tage]. Es ist eine Tendenz zu erkennen, dass die jünger geborenen Kinder auch die schwereren Formen der Frühgeborenenretinopathie aufweisen.

#### 4.2.1.4 Zeitpunkt und Art der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie

Im Durchschnitt waren die Kinder bei Behandlung  $37 (\pm 3)$  Wochen (von 32 bis 53 Wochen PMA) alt. Kein Kind wurde behandelt, bevor es 6,7 Wochen postnatales Alter, bzw. 32,4 Wochen postmenstruelles Alter erreicht hatte. Tabelle 24 zeigt eine Übersicht über das Alter der Kinder zum Zeitpunkt der Behandlung (PMA und PNA) in Abhängigkeit vom Gestationsalter bei Geburt.

## Klinische Aspekte

**Tabelle 24:** Postmenstruelles (PMA) und postnatales (PNA) Alter bei Behandlung nach Gestationsalter bei Geburt. Keine Behandlung erfolgte vor 6,7 Wochen PNA bzw. 32,4 Wochen PMA.

Gestationsalter bei Geburt [Wochen]	Alter bei der ersten Behandlung [Wochen]			
	PMA [Wochen]		PNA [Wochen]	
	Durchschnitt ( $\pm$ SD)	Min-Max	Durchschnitt ( $\pm$ SD)	Min-Max
22 (n=2)	37,7 ( $\pm$ 0,8)	37,1 – 38,3	15 ( $\pm$ 0,8)	14,4 – 15,6
23 (n=13)	36,5 ( $\pm$ 2,4)	32,9 – 40,3	12,9 ( $\pm$ 2,4)	9,7 – 16,6
24 (n=34)	37,6 ( $\pm$ 3,7)	34,3 – 53,7	13,2 ( $\pm$ 3,7)	9,9 – 29,3
25 (n=15)	37,2 ( $\pm$ 2,4)	<b>32,4 – 41,4</b>	11,8 ( $\pm$ 2,3)	<b>6,7 – 15,7</b>
26 (n=8)	38,2 ( $\pm$ 2,4)	35,0 – 41,1	11,8 ( $\pm$ 2,4)	8,3 – 14,6
27 (n=12)	38,6 ( $\pm$ 2,8)	36,1 – 43,6	11,1 ( $\pm$ 2,8)	8,3 – 15,9
29 (n=3)	38,8 ( $\pm$ 0,6)	38,1 – 39,4	9,4 ( $\pm$ 0,3)	9,1 – 9,7
30 (n=1)	38,7	38,7	8,7	8,7
31 (n=1)	44,1	44,1	12,6	12,6
37 (n=1)	48,7	48,7	11,7	11,7

Wie Abbildung 35a zeigt, lag in den meisten Fällen bilateral ein vergleichbares Stadium der Frühgeborenenretinopathie vor. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass 97 % (n=87) der im Register eingetragenen Kinder eine bilaterale Behandlung erhielten (siehe Abbildung 37a). In zwei Fällen erfolgte die Behandlung nicht am selben Tag (vier bzw. 87 Tage dazwischen). Der Großteil der bilateral behandelten Kinder (97 %, n=84) erhielt beidseits dieselbe Therapieoption.

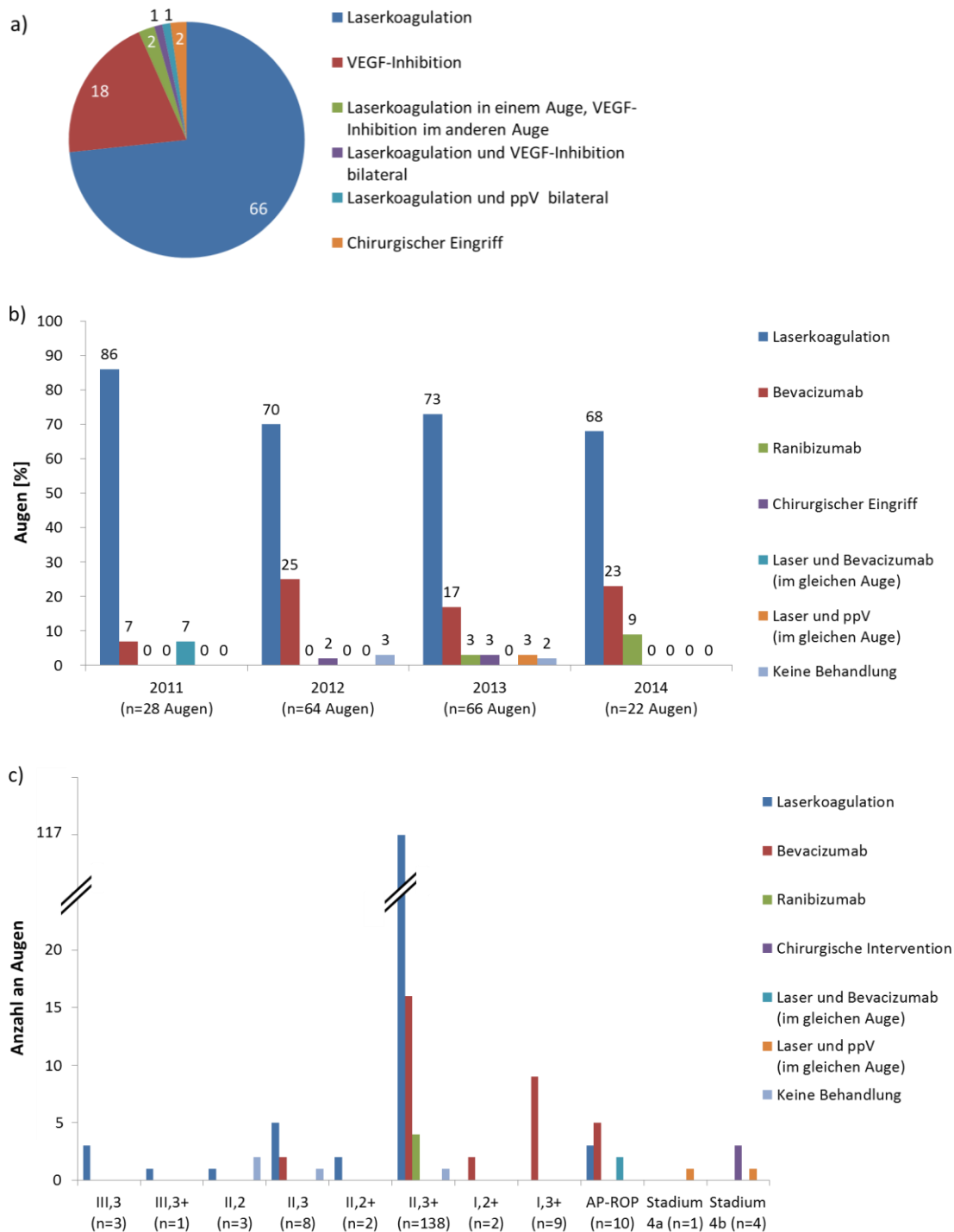
In dieser Auswertung der Registerdaten wurden Kinder berücksichtigt, die zwischen Januar 2011 und Dezember 2013 zur Welt gekommen waren. Da Ende 2011 die Ergebnisse der ersten klinischen Studie zum Einsatz von Bevacizumab bei der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie veröffentlicht wurden (73), war von Interesse, ob dies Einfluss auf die Behandlungsmodalitäten hatte. Abbildung 37b zeigt deshalb eine Übersicht über die Art der Behandlung (pro Auge) aufgetrennt nach Jahren. Aufgrund der Einschlusskriterien für diese Analyse waren die absoluten Zahlen der behandelten Augen in den Jahren 2011 und 2014 geringer, weshalb in der Abbildung zur besseren Vergleichbarkeit relative Zahlen aufgetragen sind. Während 2011 noch 86 % der Augen mit Laserkoagulation behandelt wurden, waren es 2013 nur noch 73 % und 2014 nur noch 68 %. Der Einsatz von VEGF-Inhibitoren stieg von 14 % in 2011 (vier Augen; 7 % Monotherapie (zwei Augen), 7 % kombiniert mit Laser (zwei Augen)) auf über 30 % in



2014 an. Dabei wurde Ranibizumab 2013 zum ersten Mal dokumentiert (3 %; zwei Augen), und machte 2014 bereits 9 % der Behandlungen (2/22 Augen) aus.

Die Art der Behandlung ist natürlich auch eine Funktion des vorliegenden Schweregrads der Erkrankung (siehe Abbildung 37c). So wurden die besonders schweren AP-ROP Fälle in nur drei von zehn Augen mittels Laserkoagulation behandelt, fünf von zehn Augen erhielten Bevacizumab, zwei Augen wurden gelasert und erhielten zusätzlich eine Bevacizumab Injektion. Bei den Zone I Erkrankungen (neun Augen) wurde in allen Fällen Bevacizumab eingesetzt, während Zone II Erkrankungen hauptsächlich mittels Laserkoagulation behandelt wurden (125 Augen Laserkoagulation vs. 22 Augen VEGF-Inhibition).

## Klinische Aspekte



**Abbildung 37:** Übersicht über die Verteilung der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zwischen 2011 und 2014; a) Aufteilung der Behandlungsmodalitäten nach Patienten (n=90); b) Behandlungsmodalitäten von 2011 bis 2014; aufgetragen wurden relative Zahlen, da die absolute Anzahl an behandelten Kindern in 2011 und 2014 aufgrund der Einschlusskriterien für diese Analyse deutlich unter denjenigen der Jahre 2012/2013 lag. Nach 2011 nahm die Anwendung von VEGF-Inhibitoren zu, während Laser aber immer noch die Hauptbehandlungsmodalität darstellte. c) Behandlungsmodalität als Funktion des Schweregrads der vorliegenden Frühgeborenenretinopathie. Die Art der Behandlung hängt auch ab vom vorliegenden Schweregrad; Zone I Erkrankungen wurden ausschließlich mit Bevacizumab behandelt, Zone II hauptsächlich mittels Laserkoagulation.

#### 4.2.1.5 Wiederauftreten der Frühgeborenenretinopathie und Wiederbehandlung

Es ist bekannt, dass es sowohl nach Laser, als auch nach Behandlung mit VEGF-Inhibitoren zu einem Wiederaufflammen der Frühgeborenenretinopathie, einer so genannten Recurrence kommen kann, was in vielen Fällen zu einer erneuten Behandlung führt (73). Bei einer Laserkoagulation werden zum Teil aufgrund mangelnden Funduseinblicks zu wenige Laser-Spots gesetzt, sodass die Erkrankung weiter fortschreitet. Auch für die VEGF-Inhibition gibt es Berichte, dass nach einem initial raschen Therapieansprechen nach einer gewissen Zeit die Wirkung nachlassen kann (286, 287).

Aus diesem Grund wurde auch untersucht, wie viele Kinder im Register unter welcher Behandlung eine Recurrence hatten, die mit einer erneuten Behandlung einherging. 19 % (17 Kinder, 31 Augen) der 90 behandelten Kinder hatten entweder ein Fortdauern der aktiven Erkrankung oder ein Wiederauftreten der Frühgeborenenretinopathie und benötigten mindestens eine Wiederbehandlung. Dabei waren 21 Augen (16 %) initial mit Laserkoagulation behandelt worden und acht Augen (21 %) initial mit einem VEGF-Inhibitor. Die Zeit zwischen den beiden Behandlungen betrug in der Lasergruppe im Mittel 3,8 Wochen ( $\pm 11$  Tage; 15-57 Tage), in der mit VEGF-Inhibitoren behandelten Gruppe 10,4 Wochen. Acht Augen (26 %) benötigten im weiteren Verlauf noch eine zweite Wiederbehandlung, wobei zwischen der ersten und der zweiten Wiederbehandlung im Durchschnitt 44 Tage (7-126 Tage) vergingen. Eine Übersicht über den Schweregrad, sowie die Art der Behandlung aller Augen, die eine Wiederbehandlung benötigten, ist in Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25:** Übersicht über die 17 Kinder (31 Augen), die mehrfach behandelt wurden. 1-12: initial Laserbehandlung, 13-16: initial VEGF-Inhibition, 17: initial Laser und Bevacizumab

	Erste Behandlung				Tage zw. 1. Behandlung und 1. Wiederbehandlung	1. Wiederbehandlung				Tage zw. 1. und 2. Wiederbehandlung	2. Wiederbehandlung			
	Behandeltes Auge	OD	Zeit zw. OD/OS [Tage]	OS		Behandeltes Auge	OD	Zeit zw. OD/OS [Tage]	OS		Behandeltes Auge	OD	Zeit zw. OD/OS [Tage]	OS
1	OD/OS	Bvz		Laser	23	OS	-		Bvz					
2	OD/OS	AP-ROP		AP-ROP	26	OD/OS	II 3+		II 3					
3	OD/OS	Laser		Laser	19	OD/OS	Laser		Laser	229	OS	-		Skleraband
4	OD/OS	II 3+		II 3+	34	OS	-		Laser					5
5	OD/OS	Laser		Laser	16	OD/OS	Laser		Laser + Kryokoagulation**					
6	OD/OS	II 3+		II 3+	22	OD/OS	II 3+		II 2+	29	OD/OS	Bvz		Bvz
7	OD/OS	Laser		Laser	57	OD/OS	Laser		Laser		OD/OS	AP-ROP		AP-ROP
8	OD/OS	AP-ROP		AP-ROP	20	OD/OS	AP-ROP		AP-ROP					
9	OD/OS	Laser		Laser	23	OD/OS	Skleraband + Kryokoagulation	OD 47 Tage später	Skleraband					
10	OD/OS	II 3+		II 3+	28	OD/OS	Keine Angabe		4a	39	OS			ppV + Silikonöl
11	OD/OS	Laser		Laser	32	OD/OS	ppV		Skleraband			5		4b
12	OD/OS	II 3+		II 3+	15	OD/OS	4a		4a					
13	OD/OS	Laser		Laser	23	OS	-		Laser					
14	OD/OS	II 3+		II 3+	28	OD/OS	Kryokoagulation		Kryokoagulation					
15	OD/OS	II 1		4a	32	OD/OS	II 1		4a					
16	OD/OS	ppV		ppV	15	OD/OS	ppV		ppV					
17	OD/OS	4b		5	126	OD	Bvz		Bvz					
18	OD/OS	4a		4a	6	OD/OS	4a		4a					
19	OD/OS	Laser		Laser	70	OD/OS	Laser		Laser	7	OD/OS	Laser		Laser
20	OD/OS	II 3+		II 3+	65	OD/OS	II 3+		II 3+		OD/OS	II 3+		II 3+
21	OD/OS	Laser		Laser	20	OD/OS	Laser		Laser					
22	OD/OS	II 2+		II 2+	29	OD/OS	II 2+		II 2+					
23	OD/OS	Laser+Bvz		Laser+Bvz	20	OD/OS	Laser+Bvz		Laser+Bvz		OD/OS	Bvz + Kryokoagulation		Bvz + Kryokoagulation
24	OD/OS	AP-ROP		AP-ROP		OD/OS	AP-ROP		AP-ROP		OD/OS	AP-ROP		AP-ROP

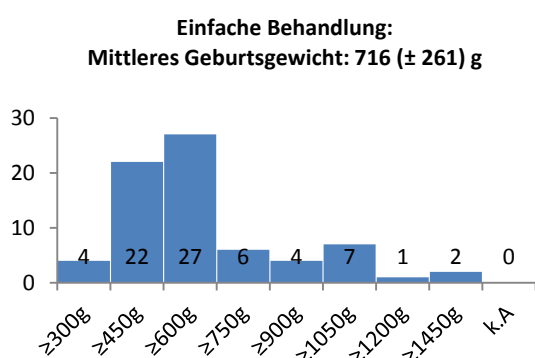
\*Stabilisierung in Stadium 4a; deshalb keine 2. Wiederbehandlung; \*\* aufgrund behinderter Fundus Einsicht; OD: rechtes Auge; OS: linkes Auge; Bvz: Bevacizumab; Rbz: Ranibizumab; ppV: pars plana Vitrektomie

#### 4.2.1.6 Assoziation demographischer Faktoren mit der Wiederbehandlungshäufigkeit

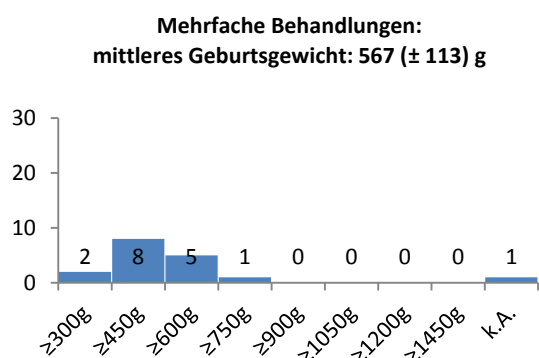
Einige Risikofaktoren für die Entwicklung einer Frühgeborenenretinopathie sind relativ gut bekannt (288-291). Man weiß auch, dass es sowohl nach Laserkoagulation als auch nach Injektion eines VEGF-Inhibitors zu einem Wiederauftreten der Erkrankung einhergehend mit einer Wiederbehandlung kommen kann (73, 286, 292), jedoch sind die Risikofaktoren für das Auftreten einer Recurrence noch nicht gut untersucht. Aus diesem Grund wurden in den Registerdaten definierte demographische und neonatologische Parameter auf ihre Assoziation mit der Wiederbehandlungshäufigkeit untersucht.

In der logistischen Regressionsanalyse der demographischen Parameter (Geschlecht, Gestationsalter, Geburtsgewicht und initiale neonatologische Betreuung) zeigte sich das Geburtsgewicht als signifikant assoziiert mit wiederholten Behandlungszyklen ( $p=0,04$ ). Dabei lag das Geburtsgewicht in der Gruppe der Kinder, die nur einmal behandelt werden mussten bei  $716 \pm 261$  g, während es in der Gruppe mit mehreren Behandlungen mit  $567 \pm 113$  g deutlich niedriger war (siehe Abbildung 38). 100 g zusätzliches Geburtsgewicht verringerten das Risiko, mehrmals behandelt werden zu müssen statistisch um 4,4 %.

a)



b)

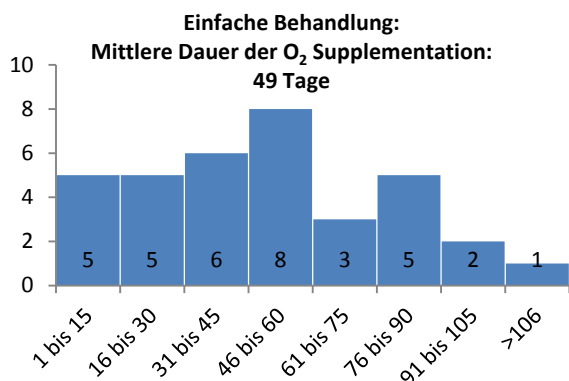


**Abbildung 38:** Histogramme des Geburtsgewichts aufgeteilt nach der Häufigkeit der Behandlung. Im Durchschnitt lag das Geburtsgewicht in der Gruppe mit nur einer Behandlung bei 716 g, in der Gruppe mit mehreren Behandlungen deutlich niedriger bei 567 g.

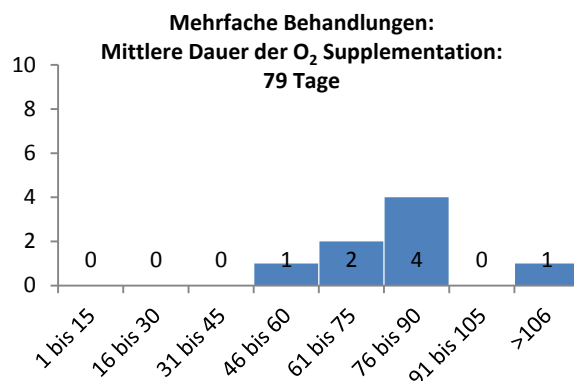
Bei Betrachtung der neonatologischen Parameter (Dauer Sauerstoffsupplementation und Anwesenheit von Komorbiditäten (darunter wurden nekrotisierende Enterokolitis, systemische Mykosen, Gehirnblutung, bakterielle Sepsis und persistierender Ductus Arteriosus zusammengefasst)) erwies sich die Dauer der Sauerstoffsupplementation als statistisch signifikant assoziiert mit dem Bedarf an mehrfachen Behandlungen ( $p=0,03$ ). Die Gruppe, die nur einmal behandelt werden musste, erhielt im Durchschnitt  $49 \pm 29$  Tage lang Sauerstoff, während in der Gruppe, die mehrmals behandelt werden musste, die Sauerstoffgabe im Schnitt  $79 \pm 18$  Tage betrug (siehe Abbildung 39).

Jeder Tag Sauerstoffsupplementation erhöhte die Wahrscheinlichkeit mehrere Behandlungen zu benötigen statistisch um 4,2 %.

a)



b)

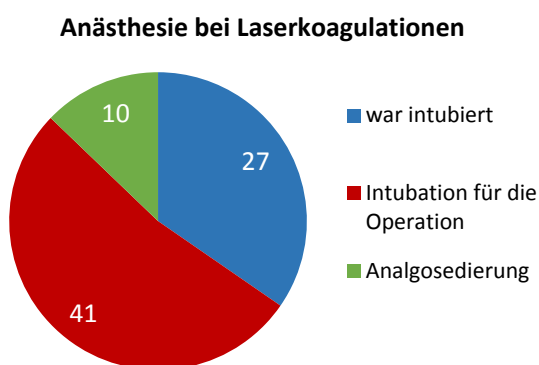


**Abbildung 39:** Histogramm der Dauer der Sauerstoffsupplementation aufgeteilt nach der Häufigkeit der Behandlung. Im Durchschnitt erhielten die Kinder mit nur einer Behandlung 49 Tage Sauerstoff, in der Gruppe mit mehreren Behandlungen dagegen 79 Tage lang.

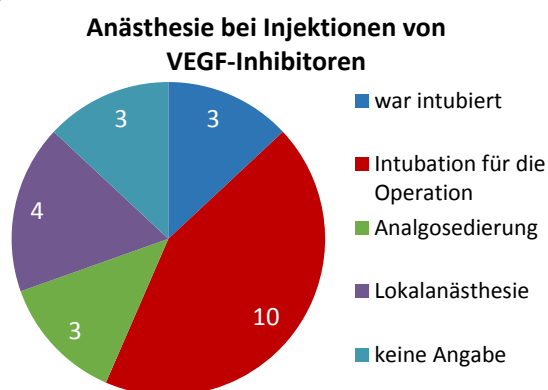
### 4.2.1.7 Verwendete Anästhetika und mit der Behandlung assoziierte Komplikationen

Bei der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie können verschiedene Methoden zur Anästhesie eingesetzt werden. Im ROP Register sind insgesamt 116 Behandlungen dokumentiert (einschließlich Wiederbehandlungen und bilaterale Behandlungen, die nicht am selben Tag stattfanden). Der Großteil der Behandlungen (darunter alle Laserkoagulationen) erfolgten unter Vollnarkose. Dagegen wurden 17 % der anti-VEGF Behandlungen (vier Behandlungen) unter Lokalanästhesie durchgeführt (siehe Abbildung 40).

a)

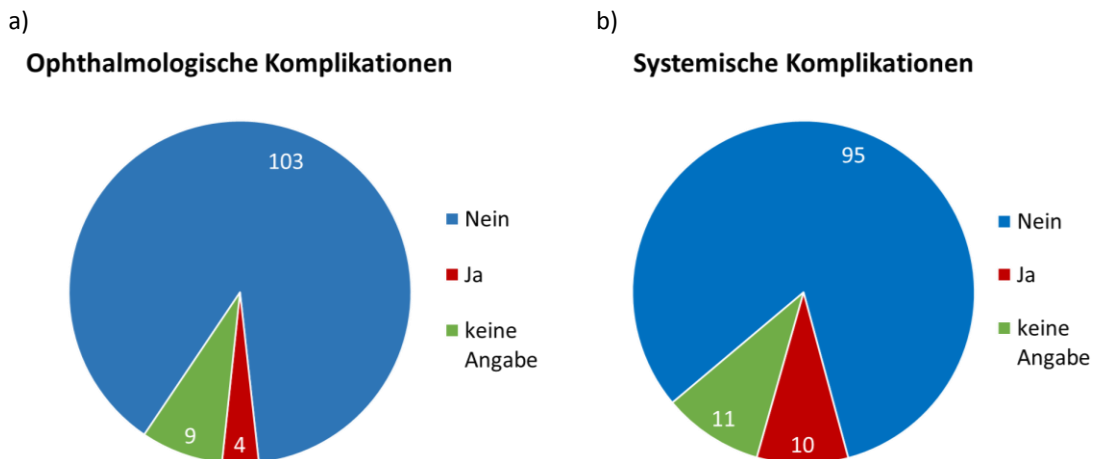


b)



**Abbildung 40:** Art der angewendeten Anästhetika bei Laserkoagulation und bei Einsatz von VEGF-Inhibitoren; a) Alle Laserkoagulationen wurden unter Vollnarkose durchgeführt; b) Vier der Behandlungen mit VEGF-Inhibitoren wurden nur unter Lokalanästhesie durchgeführt, während alle anderen unter Vollnarkose erfolgten.

Vier Kinder (3,5 %) hatten entweder während oder innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Behandlung eine ophthalmologische Komplikation (siehe Abbildung 41a). Bei acht Kindern (8,7 %, während zehn Behandlungen) traten mit der Behandlung in Zusammenhang stehende systemische Komplikationen auf (siehe Abbildung 40b). Ein Kind (bilateral Laserkoagulation), zeigte sowohl ophthalmologische, als auch systemische Komplikationen (Korneaerosion und schweren Blutdruckanstieg). Tabelle 26 stellt eine Übersicht über die ophthalmologischen und systemischen Komplikationen dar.



**Abbildung 41:** Vorkommen von ophthalmologischen (a) und systemischen (b) Komplikationen während bzw. innerhalb von 24 h nach der Behandlung. Ophthalmologische Komplikationen wurden in vier von 116 Behandlungen (3,5 %) dokumentiert. Zwei davon bei den mit Laserkoagulation behandelten Kindern (Korneaerosion, intraokulare Blutung). In zehn Kindern kam es zu systemischen Komplikationen (acht Fälle in der Laserkoagulationsgruppe und zwei in der VEGF-Inhibitionsgruppe).

**Tabelle 26:** Übersicht über die Verteilung, Art und Schweregrad der Komplikationen, die im Zusammenhang mit der Behandlung standen und während bzw. innerhalb von 24 Stunden nach dem Eingriff auftraten. a) Ophthalmologische Komplikationen, b) Systemische Komplikationen.

a)	ROP Behandlung	Auge	Ophthalmologische Komplikationen	Schweregrad	Intervention
1	bilateral Laser	OS	Korneaerosion	Mild	Topische Antibiotika
2	bilateral Laser	OS	Intraokulare Blutung	Moderat	Keine Intervention
3	bilaterale Operation	OD	Augeninnendruckerrhöhung	Keine Angabe	Topische Augentropfen
4	bilateral VEGF-Inhibition	Keine Angabe	Hornhautödem, Glaskörperschliere	Keine Angabe	Keine Angabe

b)	ROP Behandlung	Anästhesiemethode	Systemische Komplikationen	Schweregrad	Intervention
1	bilateral Laser	Intubation für die Behandlung	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe
2	bilateral Laser	Intubation für die Behandlung	Arterielle Hypertension	schwer	Blutdrucksenkende Medikamente
3	bilateral VEGF-Inhibition	Intubation für die Behandlung	Vermehrte Apnoe Phasen	moderat	Coffeincitrat
			Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	mild	O <sub>2</sub> Supplementation
			Arterieller Bluthochdruck	mild	Keine Angabe
			Bradykardie	mild	Keine Angabe
4	bilateral VEGF-Inhibition	Intubation für die Behandlung	Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	mild	23% O <sub>2</sub> für 5 Stunden
5	bilateral Laser	Intubation für die Behandlung	Neue Beatmungsbedürftigkeit	mild	Intubation für 9 Stunden
			Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	mild	O <sub>2</sub> Supplementation
			Bradykardie	mild	Keine
6	bilateral Laser	war bereits vorher intubiert	Neue Beatmungsbedürftigkeit	moderat	Re-Intubation
			Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	Moderat	Keine Angabe
			Bradykardie	schwer	Herz-Lungen-Wiederbelebung
7	bilateral Laser	war bereits vorher intubiert	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Angabe
8	unilateral Laser	war bereits vorher intubiert	Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	mild	O <sub>2</sub> Supplementation
9	bilateral Laser	war bereits vorher intubiert	Neue Beatmungsbedürftigkeit	moderat	CPAP System
			Bedarf an zusätzlichem O <sub>2</sub>	moderat	O <sub>2</sub> Supplementation für 4 Tage
10	bilateral Kryokoagulation	war bereits vorher intubiert	Neue Beatmungsbedürftigkeit	moderat	Intubation für 4 Tage



#### 4.2.2 Sicherheitsaspekte der ersten dreizehn Patienten der CARE-ROP Studie

Das zweite klinische Projekt, welches im Rahmen dieser Dissertation mitbetreut wurde, war die klinische Studie „CARE-ROP“ (Comparing Alternative Ranibizumab dosages for safety and Efficacy in Retinopathy Of Prematurity). Nachdem zehn Patienten die Kernstudie abgeschlossen hatten, fand planmäßig eine Bewertung der Sicherheitsdaten durch das Data Safety Monitoring Board statt. Die Daten, welche dem DSMB zu diesem Zeitpunkt (09.03.2016) für ihre Bewertung vorlagen, sowie weitere Sicherheitsaspekte, die bis zu diesem Zeitpunkt in der CARE-ROP Studie aufgetreten waren, werden in dieser Arbeit in verblindeter Form dargestellt.

Verschiedene in der CARE-ROP erhobene Daten lassen Rückschlüsse auf die Sicherheit des Medikaments zu: Entwicklung von Gewicht, Länge, Kopfumfang, Bedarf einer Sauerstoffsupplementation, die Augenuntersuchungen inkl. RetCam Aufnahmen, Vitalzeichen (Blutdruck, Puls, Atemfrequenz, Sauerstoffsättigung), regelmäßige Blutabnahmen zur Bestimmung der VEGF-Konzentration, Anzahl an Re-Injektionen und Rescue-Behandlungen und selbstverständlich das Auftreten von (schwerwiegenden) unerwünschten Ereignissen. Für die Sicherheitsbewertung durch das DSMB wurden nur die Re-Injektionen und Rescue-Behandlungen sowie die gemeldeten schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse in Betracht gezogen. Alle weiteren Aspekte wurden erst am Ende der Studie ausgewertet. Die Vollpublikation war zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation bei JAMA Paediatrics angenommen (76).

##### 4.2.2.1 Baselinecharakteristika der ersten 13 Patienten der CARE-ROP Studie

Zum Zeitpunkt der DSMB Bewertung waren insgesamt 13 Kinder in die Studie eingeschlossen worden, wobei zehn Kinder die Kernstudie bereits beendet hatten, während sich ein Kind noch in der Kernstudie befand und zwei Kinder verstorben waren. In den Behandlungsarm A waren sechs Patienten, in den Behandlungsarm B sieben Patienten randomisiert worden. Das Geburtsgewicht war im Behandlungsarm A mit 653 g ( $\pm 197$ ) etwas höher als im Behandlungsarm B mit 555 g ( $\pm 116$ ). Das Gestationsalter bei Geburt betrug in Arm A 24,6 Wochen, in Arm B 25,1 Wochen. Die beobachteten Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 27). Die Geschlechter Verteilung war in Arm A gleichmäßig, in Arm B waren fünf männliche Patienten und zwei weibliche Patienten eingeschlossen worden. Eine Zusammenstellung der Baselinedaten der ersten 13 Kinder der CARE-ROP Studie ist in Tabelle 27 dargestellt.

**Tabelle 27:** Baseline Charakteristika der ersten 13 Kinder, die in die CARE-ROP Studie eingeschlossen wurden

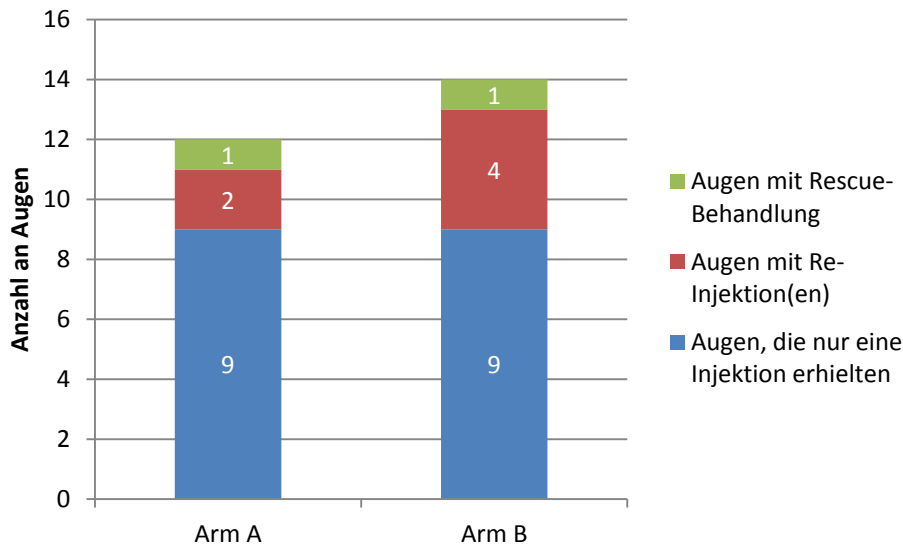
Parameter	Behandlungsarm		p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)
	Arm A (n=6)	Arm B (n=7)	
Geburtsgewicht [g], Mittelwert (±SD)	653 (197)	555 (116)	0,6572
Geburtsalter [Wochen], Mittelwert (±SD)	24,6 (1,0)	25,1 (2,0)	1,0
Geschlecht [%], männlich/weiblich	3/3	5/2	-

### 4.2.2.2 Re-Injektionen und Rescue-Fälle

In der CARE-ROP Studie gab es bis zur Beurteilung durch das DSMB sechs Re-Injektionen (in drei Kindern) und zwei Rescue-Behandlungen (in zwei Kindern). Das heißt in 69 % (18 Augen; Behandlungsarm A: 75 %; neun Augen vs. B: 64 %; neun Augen) der in der CARE-ROP Studie behandelten Augen reichte eine Injektion.

Zwei Augen (8 %) (jeweils eines in jedem Behandlungsarm) benötigten eine Rescue-Behandlung, da entweder kein ausreichendes initiales Therapieansprechen vorlag oder die Wirksamkeit innerhalb von 28 Tagen nach der Injektion wieder nachgelassen hatte. Im Behandlungsarm A erfolgte die Rescue-Laser-Behandlung 13 Tage nach der Initialbehandlung, im Behandlungsarm B wurde der Patient 19 Tage nach der ersten Behandlung mit der höheren Dosierung Ranibizumab behandelt.

Sechs Augen (23 %; Arm A: zwei Augen; Arm B: vier Augen) erhielten mindestens eine Re-Injektion (laut Studienprotokoll mindestens 28 Tage nach initialem Therapieansprechen erlaubt). Die Re-Injektionen fanden in Arm A sieben, bzw. zehn Wochen nach der initialen Behandlung statt, in Arm B zehn und 15 Wochen. Eine Übersicht über die Re-Injektionen und die Rescue-Behandlungen verteilt auf die beiden Behandlungsarme zeigt Abbildung 42.



**Abbildung 42:** Verteilung der Rescue- und Re-Injektionen auf die beiden Behandlungsarme. In beiden Armen waren je 9 Augen, die nur eine Injektion erhielten. In Arm A erhielten zwei Augen eine Re-Injektion und ein Auge eine Rescue-Therapie, in Arm B vier Augen Re-Injektionen und ein Auge eine Rescue-Behandlung.

#### 4.2.2.3 Vorkommen von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen

Insgesamt wurden bis zur Bewertung durch das DSMB bei den 13 Kindern 22 schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (SUEs) gemeldet (acht SUEs bei fünf Patienten aus Arm A, 14 SUEs bei fünf Patienten aus Arm B). Tabelle 28 zeigt eine Übersicht der dokumentierten SUEs aufgeteilt auf die beiden Behandlungsarme.

## Klinische Aspekte

**Tabelle 28:** Gemeldete schwerwiegende unerwünschte Ereignisse bis zur Beurteilung durch das DSMB am 09.03.2016 aufgeteilt nach den beiden Behandlungsarmen (A und B).

Behandlungsarm A			Behandlungsarm B		
Kind	Re-Injektionen/ Rescue?	Ereignisse	Ereignisse	Re-Injektionen/ Rescue?	Kind
1		Blut im Stuhl	Schwere arterielle Hypotonie Sepsis*		6
2		operative Behandlung eines Leistenbruchs	Krankenhauseinweisung aufgrund einer Shuntinfektion (Hydrocephalus), operative Entfernung des Shunts		7
		Wundentzündung an der Stelle, des operativ geschlossenen Leistenbruchs	Status nach Shunt Operation		
3	zwei Re-Injektionen, jeweils bilateral	Status nach intestinaler Operation mit Nahtinsuffizienz Infektion des zentralvenösen Katheters (neue) Infektion des zentralvenösen Katheters	Hodentorsion Vermutete Entzündung Erbrechen elektive Relaparotomie zur Stoma Entfernung und End-zu-End-Anastomose Lungenentzündung	Re-Injektion, bilateral	8
4		elektive Laparotomie zur Reanastomose des Dünndarms	Amotio Retinae (Netzhautablösung)		9
5		Nierenversagen*, Lebersversagen, Hypertension, BPD	Entzündung der oberen Atemwege Hospitalisierung für orale Propranolol Behandlung (periaurikuläres Hämangiom, bestand bereits vor Studieneinschluss) Hospitalisierung für erste Re-Injektion mit Ranibizumab nach Protokoll aufgrund einer Reaktivierung der ROP Hospitalisierung für zweite orale Propranolol Behandlung (periaurikuläres Hämangiom)	Re-Injektion bilateral	10

\* tödliche SUEs

Numerisch sind in Behandlungsarm B mehr SUEs als in Arm A aufgetreten (8 vs. 14), in beiden Armen waren jedoch jeweils fünf Kinder von den SUEs betroffen. Nach Beurteilung der jeweiligen Neonatologen/Ophthalmologen wurde keines der gemeldeten SUEs mit der Behandlung in Verbindung gebracht. Besondere Beachtung müssen natürlich die Ereignisse finden, welche lebensbedrohlich oder im schlimmsten Fall tödlich waren (auf die Todesfälle wird in Abschnitt 4.2.2.4 näher eingegangen): Bei einem Kind kam es während der Narkose für die intravitreale Injektion zu einer akuten arteriellen Hypotension, welche als lebensbedrohlich eingestuft wurde. Hier gab es in der Anamnese bereits einige hypotensive Krisen bei anderen operativen Eingriffen, sodass die aktuelle Episode eher der Anästhesie, als der intravitrealen Injektion zugeschrieben wurde. Ein okuläres Ereignis (Amotio Retinae) wurde auf die mangelnde Wirksamkeit der Studienmedikation zurückgeführt. In diesem Fall wurde das Kind im weiteren Verlauf mit einer pars plana Vitrektomie, einer Laserkoagulation und einer weiteren Injektion der Studienmedikation behandelt. Das Ergebnis der Behandlung lag zum Zeitpunkt der DSMB Bewertung noch nicht vor. Alle weiteren Ereignisse wie Probleme im Intestinaltrakt und der Lunge kommen bei der Patientenpopulation der CARE-ROP Studie, den extrem frühgeborenen Kindern, auch ohne Behandlung häufig vor (293). Bei einer Zusammenfassung der unerwünschten Ereignisse in Systemorganklassen, waren Infektionen das häufigste unerwünschte Ereignis, und kamen insgesamt bei 54 % der Kinder vor. Auch der Gastrointestinaltrakt war bei 31 % der Kinder von einer Nebenwirkung betroffen.

#### 4.2.2.4 Todesfälle

Bis zur Bewertung durch das DSMB kam es in beiden Armen zu jeweils einem Todesfall. In Arm A lagen zwischen der Studienbehandlung und dem Todesfall 16 Wochen und vier Tage. Das Kind verstarb an akutem Nierenversagen nach Leberversagen, welches das Kind nach Annahme der behandelnden Ärzte aufgrund der lang andauernden parenteralen Ernährung entwickelt hatte. Es wurde kein kausaler Zusammenhang zwischen der Studienbehandlung und dem Tod des Kindes gesehen. In Arm B lagen zwischen der Studienbehandlung und dem Versterben des Kindes 14 Wochen und drei Tage. Zum Tod kam es bei diesem Kind aufgrund einer Sepsis. Auch in diesem Fall wurde von den behandelnden Ärzten kein Zusammenhang zwischen der Studienmedikation und dem Versterben des Kindes gesehen. Weitere Angaben über Komorbiditäten und Vorerkrankungen wurden vom Zentrum nicht gemacht.

#### 4.2.3 Überprüfung des Einflusses präanalytischer Parameter auf die systemischen VEGF-Konzentrationen

Die systemische Sicherheit von VEGF-Inhibitoren ist besonders bei Frühgeborenen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden in der CARE-ROP Studie zu festgelegten Zeitpunkten Blutproben zur Bestimmung des Plasma-VEGF-Spiegels abgenommen. Die Untersuchung der Blutproben aus der CARE-ROP Studie war nicht Teil dieser Arbeit. Es wurde jedoch ein Vorprojekt zur Standardisierung verschiedener prä-analytischer Parameter bei der Messung von VEGF-A in der CARE-ROP Studie durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieses Vorprojekts dargestellt.

Bei den angegebenen VEGF-A-Spiegeln handelt es sich, außer wenn explizit Luminex genannt wird, um mittels ELISA gemessene Werte. An den Entnahme- und Messzentren wurden die Proben in technischen Duplikaten vermessen und der Mittelwert daraus berechnet. Das Zentrallabor hat die Proben in technischen Unikaten vermessen.

Die Bestimmung der unabhängigen Confounder der VEGF-A-Messung erfolgte mittels Regressionsanalyse. Um den Einfluss der Parameter auf die mittleren Werte und die Streuung der Werte besser zu visualisieren, wurden die einzelnen Parameter zusätzlich noch mittels einer deskriptiven Analyse untersucht und graphisch dargestellt.

#### 4.2.3.1 Regressionsanalyse

Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse der Regressionsanalyse, wobei die Parameter *Antikoagulans*, *Zentrifugenart*, *Messzentrum*, *Messmethode* und *Geschlecht des Probanden* als statistisch signifikante unabhängige Confounder der VEGF-A-Spiegelmessung identifiziert wurden.

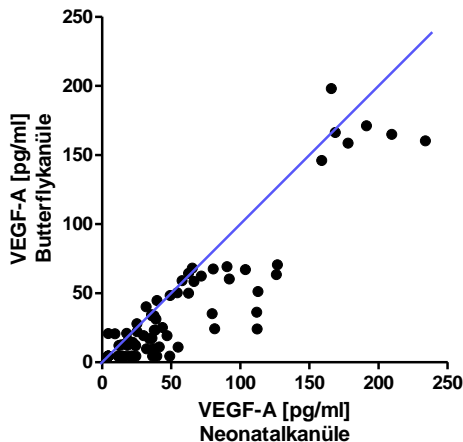
**Tabelle 29:** Ergebnisse der Regressionsanalyse des Vorprojekts zur VEGF-Messung. Die ersten beiden Spalten zeigen die untersuchten Parameter. Der Parameter, der in der zweiten Spalte „fett“ gedruckt ist, ist in dieser Zeile der Referenzparameter. Die dritte Spalte zeigt das Ausmaß des Einflusses des jeweiligen Parameters im Regressionsmodell: z.B. führt die Verwendung des Ausschwenkrotors zu VEGF-A-Spiegeln, die im Vergleich zum Feststellrotor um 23,2 pg/ml niedriger sind.

Potentieller Confounder		Mittlere Abweichung der VEGF-A-Ergebnisse (zum Schätzwert) [pg/ml] ( $\pm$ SD)	p-Werte	Signifikanz
	(Intercept)	68,1 ( $\pm$ 7,1)	<0,001	***
Kanüle	Neonatal vs. <b>Butterfly</b>	5,0 ( $\pm$ 5,0)	0,322	ns
Antikoagulans	PECT vs. <b>EDTA</b>	-33,8 ( $\pm$ 4,8)	<0,001	***
	CTAD vs. <b>EDTA</b>	-73,4 ( $\pm$ 7,7)	<0,001	***
Füllstand des Entnahmeröhrchens	Halb gefüllt vs. <b>vollständig gefüllt</b>	7,1 ( $\pm$ 4,0)	0,0741	ns
Zeit vor Zentrifugation	Zeit bis zur Zentrifugation: 2 h vs. <b>30 min</b>	-8,3 ( $\pm$ 6,3)	0,188	ns
Zeit nach Zentrifugation	Zeit nach Zentrifugation: 3-4 h vs. <b>sofort</b>	-0,04 ( $\pm$ 6,9)	0,995	ns
	Zeit nach Zentrifugation: 6 h vs. <b>sofort</b>	7,7 ( $\pm$ 7,3)	0,293	ns
Zentrifugenart	Ausschwenkrotor vs. <b>Feststellrotor</b>	-23,2 ( $\pm$ 5,7)	<0,001	***
Messmethode	Luminex vs. <b>ELISA</b>	-38,1 ( $\pm$ 5,1)	<0,001	***
Messzentrum	Zentrum A vs. <b>Zentrallabor</b>	-5,5 ( $\pm$ 6,5)	0,396	ns
	Zentrum B vs. <b>Zentrallabor</b>	-21,3 ( $\pm$ 6,6)	0,001	**
	Zentrum C vs. <b>Zentrallabor</b>	-26,1 ( $\pm$ 8,5)	0,002	**
	Zentrum D vs. <b>Zentrallabor</b>	-32,2 ( $\pm$ 8,5)	<0,001	***
	Zentrum E vs. <b>Zentrallabor</b>	35,2 ( $\pm$ 8,0)	<0,001	***
	Zentrum F vs. <b>Zentrallabor</b>	32,9 ( $\pm$ 8,0)	<0,001	***
Geschlecht	weiblicher vs. <b>männlicher</b> Proband	23,6 ( $\pm$ 3,7)	<0,001	***
Intrapersoneller Unterschied über die Zeit	Woche 2 vs. <b>Woche 1</b>	-2,9 ( $\pm$ 3,6)	0,423	ns

\*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001; ns: nicht statistisch signifikant.

#### 4.2.3.2 Art der Kanüle

Abweichungen bei der Blutentnahme können einen großen Einfluss auf die resultierenden Messwerte haben. So kann z.B. eine vermehrte Zellyse bei der Blutentnahme durch Ausschüttung des thrombozytär gespeicherten Kaliums zu extrem erhöhten Plasma-Kaliumwerten führen (294). Da auch VEGF-A in den Thrombozyten gespeichert wird (295), könnte dies somit auch für VEGF-A relevant sein. Einen Faktor für die Zellyse bei der Blutentnahme stellen die Scherkräfte dar, die durch den Sog auf die Thrombozyten einwirken können. Bei der Population der CARE-ROP Studie, erfolgen die Blutentnahmen im Tropfverfahren (ohne angelegtes Vakuum) mit einer 23G Neonatalkanüle. Das kleinere Lumen könnte möglicherweise zu einer vermehrten Lyse der Thrombozyten führen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich in Abhängigkeit von der verwendeten Kanüle (Neonatalkanüle vs. Butterflykanüle) die VEGF-A-Spiegel unterscheiden (Abbildung 43).



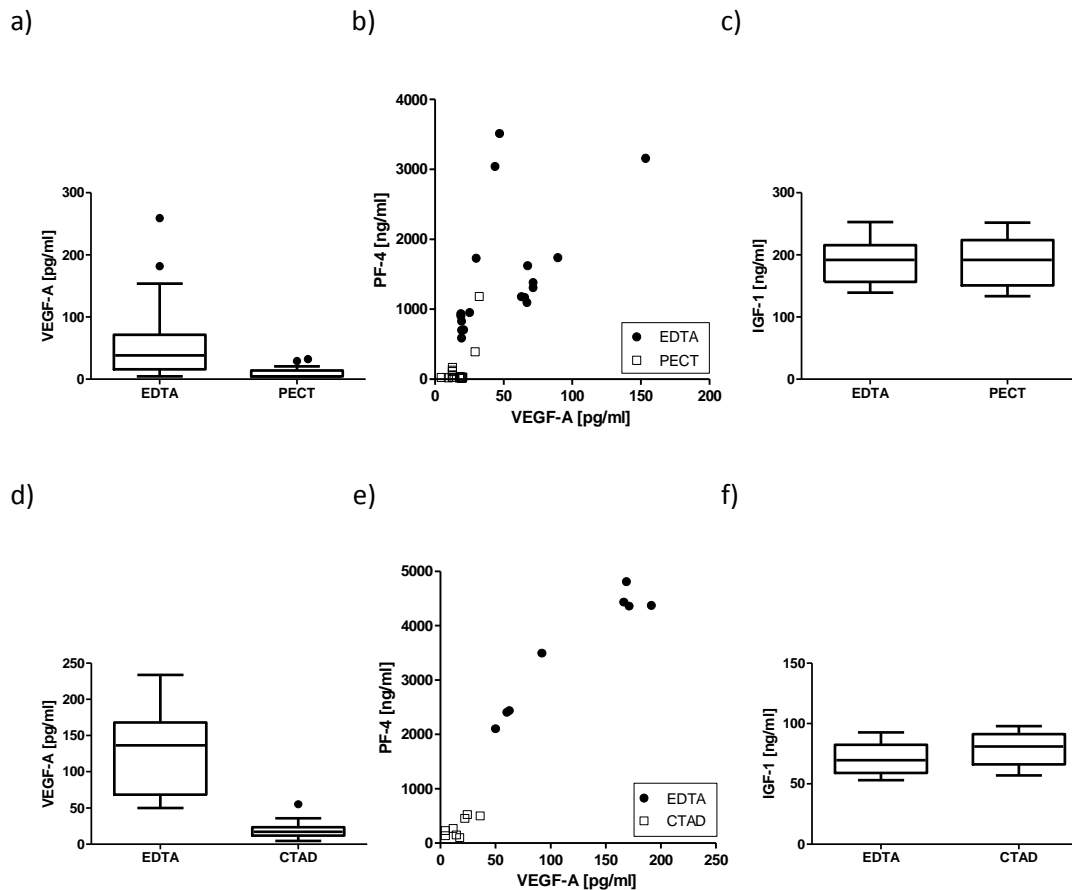
**Abbildung 43:** Scatterplot des Einflusses der Kanüle auf gemessene VEGF-Spiegel (Neonatalkanüle vs. Butterflykanüle). Punkte, die auf oder nahe der blauen Winkelhalbierenden liegen, zeigen eine gute Übereinstimmung der Messwerte.

Punkte, die auf der blauen Winkelhalbierenden liegen, stehen für die Proben, die bei Abnahme mit der Butterflykanüle und der Neonatalkanüle dieselben Werte ergaben. Es besteht ein Trend zu höheren Werten bei Abnahme mit der Neonatalkanüle, welcher jedoch nicht signifikant war. Der Großteil der Punkte liegt auf oder nahe der Winkelhalbierenden.

#### 4.2.3.3 Antikoagulantien

Auch die eingesetzten Antikoagulantien spielen bei der Verhinderung einer Thrombolyse eine große Rolle. EDTA ist das wohl am häufigsten eingesetzte Antikoagulans, jedoch wird sowohl für PECT als auch CTAD eine bessere Hemmung der Thrombozytenaktivierung berichtet (272, 273, 296).

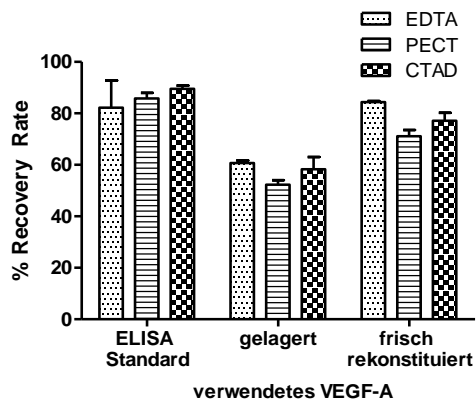
In unserer Studie zeigte sich, dass die Verwendung von PECT und CTAD als Antikoagulans in deutlich niedrigeren VEGF-A-Spiegeln resultierte als EDTA. Ein Grund dafür könnte eine stärkere Thrombozytenaktivierung in den EDTA-Proben sein, auf die auch die erhöhten PF-4-Spiegel in diesen Proben hindeuten. Beim Vergleich der VEGF-A-Absolutwerte aus PECT und CTAD Blutproben, scheint CTAD die Thrombozytenaktivierung sogar noch besser zu verhindern als das Antikoagulans PECT. Die Messung anderer Proteine, hier beispielhaft IGF-1, wird nicht von den drei verwendeten Antikoagulantien beeinflusst.



**Abbildung 44:** Einfluss der verwendeten Antikoagulantien (EDTA, PECT und CTAD) auf die Plasmaspiegel von VEGF-A, PF-4 und IGF-1. Die VEGF-A-Spiegel, die in PECT- (a) und CTAD-Plasma (d) gemessen wurden, waren deutlich niedriger als in EDTA-Plasma. Ein gleiches Muster war für PF-4 (b, e) zu sehen, was für eine erhöhte Thrombozytenaktivierung in EDTA-Plasma spricht. IGF-1-Spiegel wurden durch die Wahl des Antikoagulans nicht beeinflusst (c, f).



Um zu überprüfen, ob die Antikoagulantien EDTA, PECT und CTAD mit dem ELISA-Assay für VEGF-A interferieren, wurde als Kontrollgruppe PBS (ohne Blutprobe) in Entnahmeröhrchen gegeben und wie normale Blutproben behandelt (Kühlung falls nötig, Zentrifugation etc.). Nach der Aliquotierung wurde das PBS, mit einer definierten Menge VEGF-A versetzt und anschließend die Konzentration bestimmt. Dabei kamen das Standardprotein aus dem VEGF ELISA Kit oder rekombinantes humanes VEGF-A, das frisch rekonstituiert wurde bzw. bereits längere Zeit bei -80°C gelagert worden war, zum Einsatz.



**Abbildung 45:** Prozentrate an VEGF-A, welches in EDTA-, PECT- oder CTAD-PBS wiedergefunden wurde. PECT und CTAD interferieren nicht stärker mit dem VEGF ELISA als EDTA.

Die Recovery Raten von EDTA, PECT und CTAD in diesem Versuch unterschieden sich nur minimal, was dafür spricht, dass PECT und CTAD nicht stärker mit dem VEGF-A ELISA interferieren als EDTA selbst. Die Recovery Rate für das bereits längere Zeit gelagerte rekombinante VEGF-A ist jedoch deutlich geringer als für das frisch rekonstituierte VEGF-A, was für einen Verlust an Bindungsaktivität durch die lange Lagerung spricht.

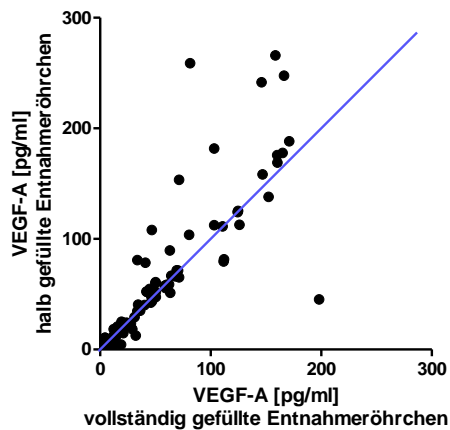
#### 4.2.3.4 Füllstand der Blutröhrchen

Gerade bei den sehr vulnerablen Frühchen, die in der CARE-ROP Studie behandelt wurden, kann es vorkommen, dass eine Blutentnahme nur schwer möglich ist, bzw. dass eventuell nicht die im Prüfplan vorgeschriebene Menge entnommen werden kann und die Blutentnahmeröhrchen nur zur Hälfte gefüllt sind. Dadurch entsteht ein geändertes Verhältnis des Volumens der Blutprobe zum Volumen des Antikoagulans.

Abbildung 46 zeigt, dass es zwar einen Trend zu höheren Werten, in den nur halb gefüllten Entnahmeröhrchen gibt, die meisten Punkte sich jedoch auf bzw. nahe der Winkelhalbierenden

## Klinische Aspekte

befinden, was für eine gute Korrelation der Messwerte unabhängig vom Füllstand des Entnahmeröhrchens spricht. Auch in der linearen Regressionsanalyse wurde der Füllstand nicht als unabhängiger Confounder der VEGF-A-Messung identifiziert.

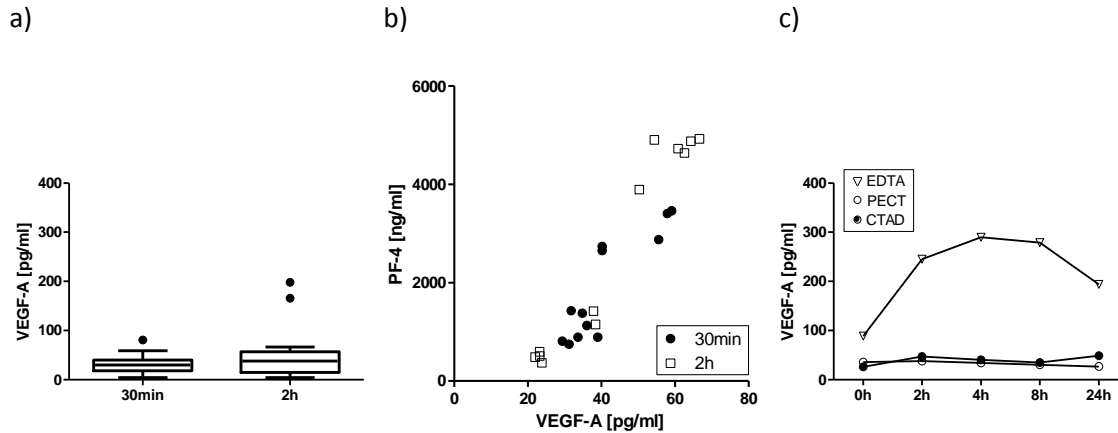


**Abbildung 46:** Einfluss des Füllstands der Entnahmeröhrchen auf die gemessenen VEGF-Spiegel

### 4.2.3.5 Zeit vor und nach Zentrifugation

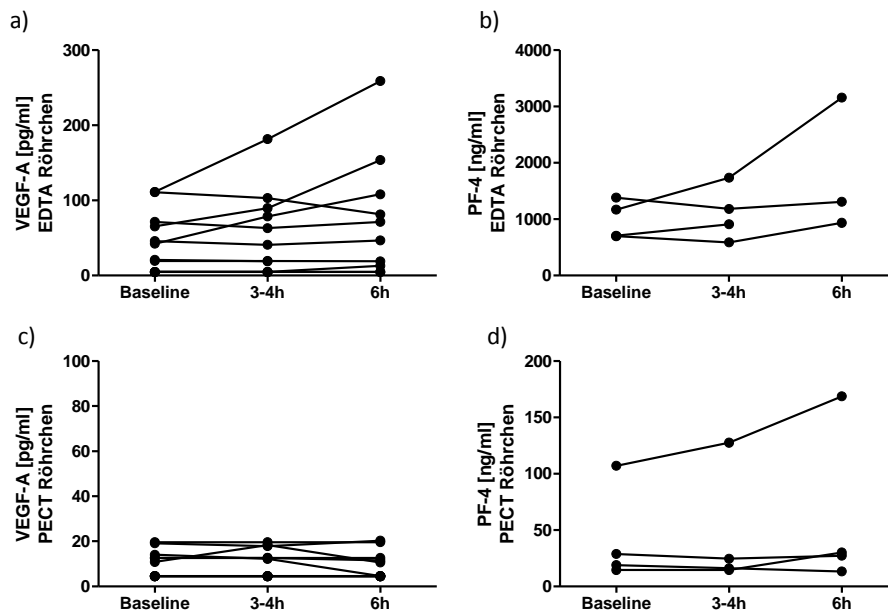
Oft können im Klinikalltag die Proben nicht sofort nachdem sie entnommen wurden, weiter verarbeitet werden. Deshalb wurde auch der Einfluss einer etwas längeren Wartezeit vor der Zentrifugation auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel untersucht. Abbildung 47a zeigt, dass in den bei Raumtemperatur gelagerten EDTA-Proben die VEGF-A-Spiegel nur vereinzelt anstiegen, während im Großteil der Proben nach 2 h Wartezeit in etwa gleiche Werte gemessen wurden. Bei den PF-4 Werten lag eine leichte Tendenz zu höheren Werten in den länger gelagerten Proben (Abbildung 47b) vor, die auch mit den höheren VEGF-A-Werten korrelierten. Der Unterschied war in der logistischen Regression jedoch nicht signifikant (siehe Tabelle 29).

In einer Zusatzauswertung wurden die EDTA-, CTAD- und PECT-Proben noch länger (bis zu 24 h) bei den jeweiligen Bedingungen (EDTA, CTAD: RT; PECT: 4°C) gelagert, bevor die Proben zentrifugiert wurden. Dabei blieben die CTAD- und PECT-Proben bis zu 24 h konstant auf niedrigem Niveau, während die EDTA-Proben in diesem Versuch bereits nach 2 h Lagerung deutlich anstiegen (Abbildung 47c).



**Abbildung 47:** Einfluss der Zeit vor der Zentrifugation auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel; a) Die VEGF-A-Spiegel in EDTA-Proben, die vor Zentrifugation 30 min bzw. 2 h gelagert wurden, unterschieden sich geringfügig; b) In den PF-4-Spiegeln zeigte sich nach längerer Wartezeit eine leichte Tendenz zu etwas höheren Werten; c) In einer Zusatzauswertung wurden EDTA-, PECT- und CTAD-Blutproben bis zu 24 h vor Zentrifugation gelagert: Die VEGF-A-Spiegel in den EDTA-Proben waren deutlich erhöht, während die PECT- und CTAD-Proben relativ gleichbleibend niedrig waren.

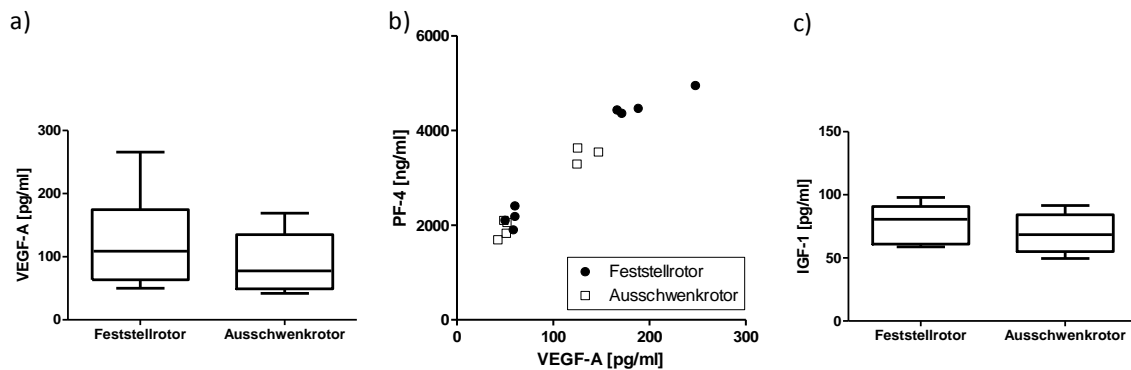
Auch die Zeit nach der Zentrifugation wurde in einem Teil der EDTA- und PECT-Proben untersucht. Hierfür wurden die zentrifugierten Proben bei Raumtemperatur (EDTA), bzw. im Kühlschrank (PECT) bis zu 6 h aufbewahrt und Plasmaaliquots nach ca. 3-4 h und nach 6 h entnommen. Dabei wurden in einzelnen EDTA-Proben nach 6 h Wartezeit höhere VEGF-A-Spiegel gemessen, während die PECT-Proben konstant auf deutlich niedrigerem Niveau blieben (Abbildung 48a/c). Auch hier war der Unterschied in der linearen Regression nicht signifikant. Ein ähnliches Bild zeigte auch die Messung der PF-4-Spiegel der dazugehörenden Proben (Abbildung 48b/d; man beachte die unterschiedliche y-Achsenkalierung). Ein weiterer Hinweis für eine stärkere Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch die Verwendung des Antikoagulans PECT im Vergleich zu EDTA.



**Abbildung 48:** Einfluss der Lagerzeit nach der Zentrifugation auf EDTA- (a, b) und PECT- (c, d) Proben. EDTA-Proben resultierten generell in höheren VEGF-A-Werten als die PECT-Proben. In einzelnen EDTA-Proben stiegen die Messwerte deutlich an, während sie in den PECT-Proben stabil niedrig blieben. Die PF-4-Werte zeigten ähnliche Tendenzen wie VEGF, was für eine stärkere Aktivierung der Thrombozyten in EDTA-Plasma spricht. (Man beachte die unterschiedliche Achsenbeschriftung (VEGF-A wird in pg/ml gemessen, PF-4 in ng/ml) sowie die Skalierung)

### 4.2.3.6 Zentrifugenart

Die Zentrifugenbauweise könnte ebenfalls einen Einfluss auf die VEGF-A-Messwerte haben, da durch die verschiedenen Rotoren (Feststellrotor vs. Ausschwenkrotor) auch die Zellpelletbildung und deren Dichte beeinflusst wird. Somit ist vorstellbar, dass sich die im Plasma befindlichen Kontaminationen (z.B. Zellreste), welche VEGF-A enthalten können, zwischen den Zentrifugenarten unterscheiden. Die Messwerte von Plasmaproben, die mit einer Zentrifuge mit Feststellrotor verarbeitet wurden, waren im Vergleich zu den Werten aus der Zentrifuge mit Ausschwenkrotor höher (Abbildung 49a). Auch in der linearen Regression war dieser Unterschied signifikant. Gleiches galt für die PF-4 Werte, die bei Zentrifugation mit einem Feststellrotor deutlich erhöht waren (b). Auf die IGF-1-Spiegel hatte die Zentrifuge keinen Einfluss (c).

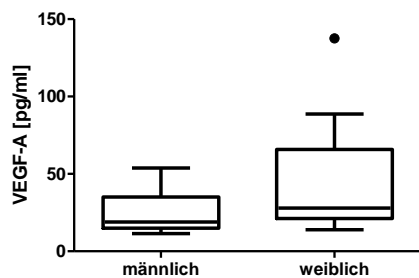


**Abbildung 49:** Einfluss der Zentrifugenart (Feststellrotor vs. Ausschwenkrotor) auf die VEGF-A-, PF-4- und IGF-1-Messwerte. Die im Feststellrotor zentrifugierten Proben tendierten zu höheren VEGF-A-Messwerten als im Ausschwenkrotor. Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls für den Marker der Thrombozytenaktivierung PF-4, während die IGF-1-Spiegel von der Zentrifugenart kaum beeinflusst wurden.

#### 4.2.3.7 Geschlecht

Der Einfluss des Geschlechts war bereits in der linearen Regression signifikant.

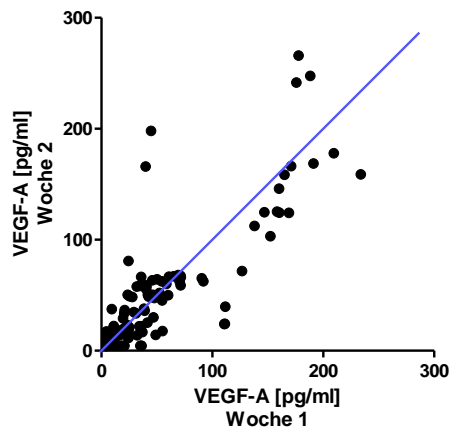
In einem zusätzlichen Versuch wurde zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal vier männlichen und vier weiblichen Probanden Blut abgenommen (EDTA, PECT und CTAD). Die Ergebnisse aus der ursprünglichen Auswertung wurden auch in diesem zusätzlichen Datensatz durch einen Trend zu höheren VEGF-A-Spiegeln bei weiblichen Probanden im Vergleich zu männlichen Probanden bestätigt.



**Abbildung 50:** Einfluss des Geschlechts auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel in der zusätzlichen nachgeschalteten Analyse. Auch hier zeigte sich eine Tendenz zu höheren Messwerten bei den weiblichen Probanden. (ursprüngliche Werte sind hier nicht gezeigt)

### 4.2.3.8 Intrapersonelle Fluktuationen der VEGF-A-Spiegel im Verlauf einer Woche

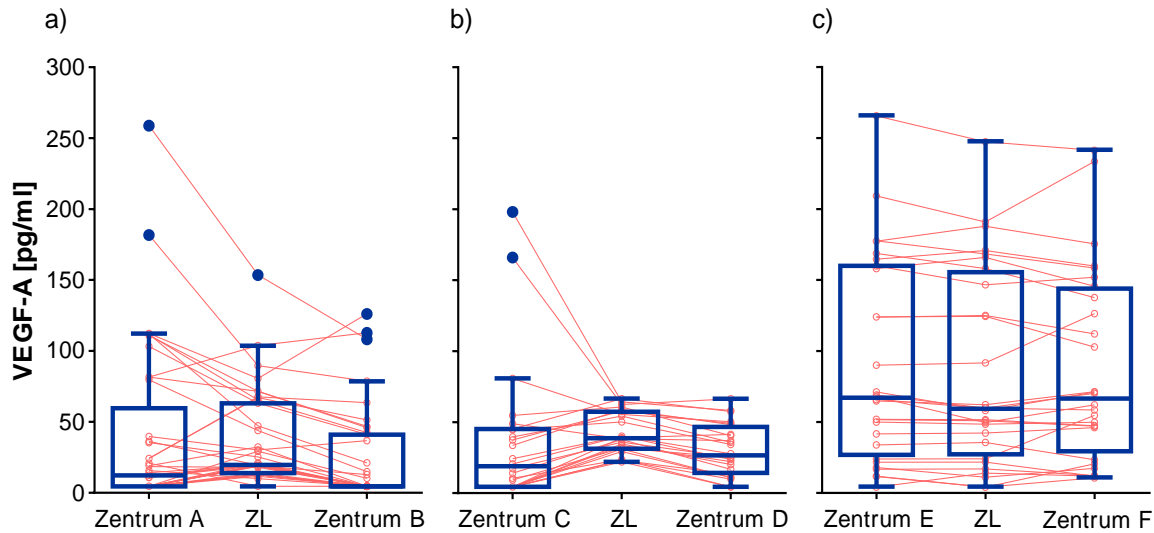
Ein weiterer Aspekt, der im Rahmen dieses Projekts untersucht werden sollte, war die Schwankung der VEGF-A-Werte über die Zeit. Hierfür wurde der Versuch im Abstand einer Woche in ansonsten identischer Vorgehensweise wiederholt. Abbildung 51 zeigt, dass es im Mittel kaum Unterschiede in den VEGF-A-Spiegeln an Baseline und eine Woche später gab, denn der Großteil der Werte liegt auf oder nahe der Winkelhalbierenden. Die vorhandenen Unterschiede wurden in der linearen Regressionsanalyse nicht als unabhängige Confounder identifiziert.



**Abbildung 51:** Scatterplot des Vergleichs der VEGF-A-Spiegel an Baseline und eine Woche später. Die Messwerte lagen Großteils nahe bzw. auf der Winkelhalbierenden, was für eine gute Korrelation der Messwerte zwischen den zwei Zeitpunkten spricht. Einzelne Werte weichen jedoch deutlich von der Winkelhalbierenden ab.

### 4.2.3.9 Messzentren

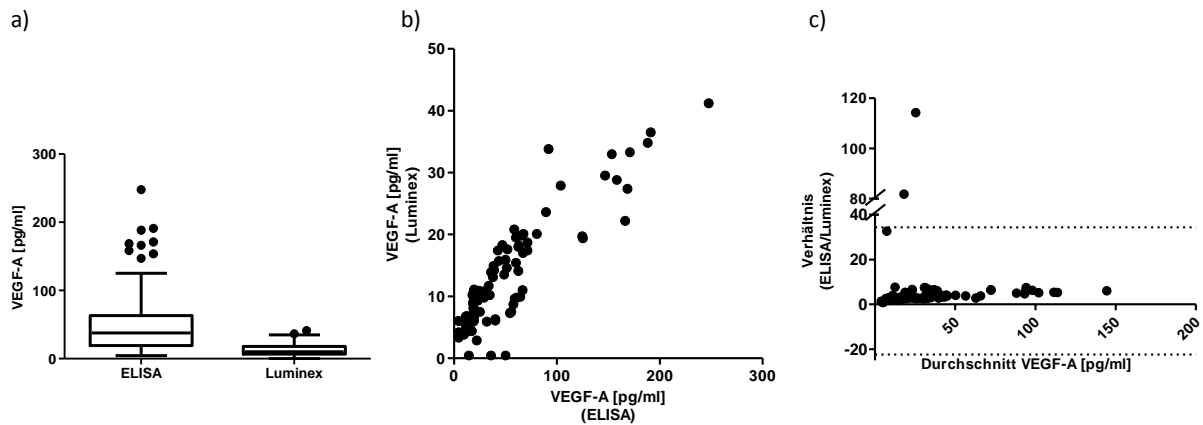
Das VEGF-A-Messprojekt wurde als Ringversuch durchgeführt. Dabei wurde neben anderen Parametern auch untersucht, in wie weit verschiedene Zentren aus den gleichen Proben unter Verwendung desselben ELISA-Kit-Batches vergleichbare Werte messen. Die Proben waren insofern gleich, als dass sie Plasmaaliquots aus Blutproben von einer Person waren, die auf definierte Weise prä-analytisch verarbeitet wurden. Abbildung 52 zeigt die enorm große Variabilität, die dabei entstand: es gab Zentren, bei denen sich die Messwerte zum Teil um 100 pg/ml zwischen Messzentrum und Zentrallabor unterschieden (z.B. Zentrum A:  $R^2 = 0,79$ ; Zentrum C:  $R^2 = 0,5$ ; siehe Abbildung 52a). Es gab jedoch auch Zentren (z.B. Zentrum E:  $R^2 = 0,98$  und F:  $R^2 = 0,95$ ) bei denen eine sehr gute Korrelation zwischen den Messwerten des Zentrallabors und dem zugehörigen Messpärchen bestand (siehe Abbildung 52c).



**Abbildung 52:** Gepaarte Plots (rosa) und Boxplots (blau) der VEGF-A-Spiegel, die an den Blutentnahmezentren, den korrespondierenden Messzentren und dem Zentrallabor (ZL) gemessen wurden. Linien verbinden die VEGF-A-Messwerte der gleichen Proben der drei Zentren.

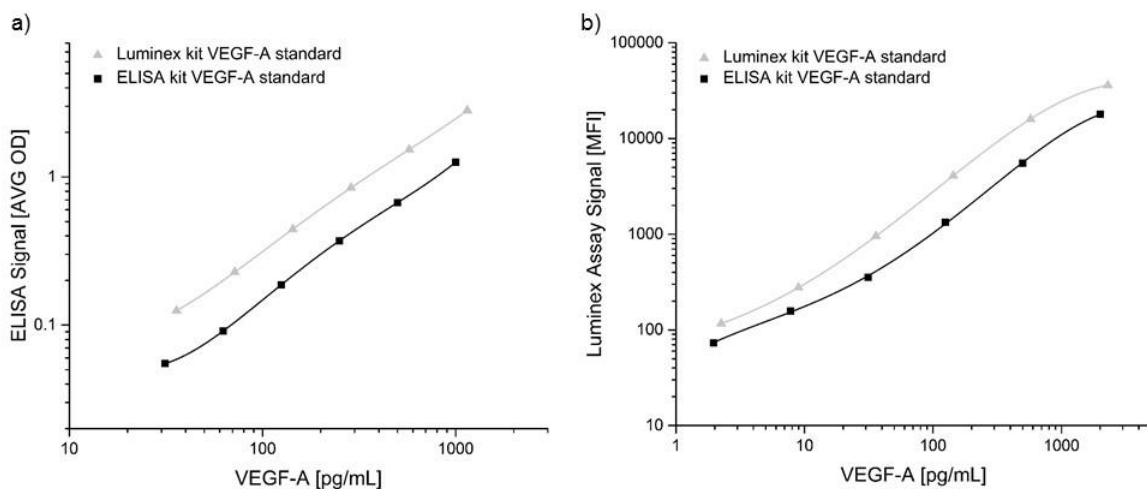
#### 4.2.3.10 Einfluss der Messmethodik auf VEGF-A-Spiegel

VEGF-A-Spiegel werden in der Literatur am häufigsten mittels ELISA- und Luminex-Assay bestimmt (74, 274, 279-281), weshalb auch in diesem Projekt diese beiden Methoden verglichen wurden. In Abbildung 53a ist erkennbar, dass die aus der Luminex-Methode resultierenden VEGF-A-Messwerte deutlich niedriger waren, als die ELISA-Ergebnisse. Dabei lag der Median bei 10 pg/ml [IQR: 7-18 pg/ml] (Luminex), bzw. bei 36 pg/ml [IQR: 19-63 pg/ml] (ELISA). Auch in der logistischen Regression wurde der Einfluss der Messmethode als statistisch signifikant bewertet. Dass im Scatterplot fast alle Punkte auf oder zumindest nahe einer Geraden liegen (Abbildung 53b), zeigte jedoch die gute Korrelation der Messwerte. Auch im Bland-Altman Plot (Abbildung 53c) erkennt man, dass zwar keine identischen Werte mit den beiden Methoden erreicht werden, sie jedoch miteinander korrelieren. Diese Verschiebung der gemessenen Absolutwerte muss beim Vergleich von VEGF-A-Ergebnissen z.B. aus klinischen Studien beachtet werden.



**Abbildung 53:** Vergleich der ELISA- und Luminex-Messwerte. a) Die Boxplots zeigen die deutlich niedrigeren Werte der Luminex-Messmethode. b, c) Im Scatterplot und im Bland-Altman-Plot wird die gute Korrelation zwischen den Messwerten der beiden Methoden erkennbar.

Um die Unterschiede zwischen den beiden Assays genauer zu untersuchen, wurden im Zentrallabor in beiden Methoden Standardkurven mit dem Kalibrator Protein aus dem ELISA- und dem Luminex-Assay vermessen. Dabei zeigte sich, dass das Protein aus dem Luminex-Kit, in beiden Methoden ein stärkeres Signal bei gleichen Konzentrationen hervorruft (siehe Abbildung 54). Das wiederum bedeutet, dass die Konzentrationen der Proben, die sich aus der Luminex-Standardkurve errechnen, niedriger sind, als die aus der ELISA-Standardkurve, unabhängig vom verwendeten Assay.



**Abbildung 54:** Standardkurve der Standard-Proteine (VEGF-A) aus dem ELISA- und dem Luminex-Kit vermessen in beiden Kits; das Luminex Standard-Protein ergab in beiden Messmethoden (bei gleichen Konzentrationen) eine höhere Signalstärke. Durch Verwendung dieser Standardkurve ergeben sich automatisch niedrigere VEGF-A-Messwerte im Luminex.



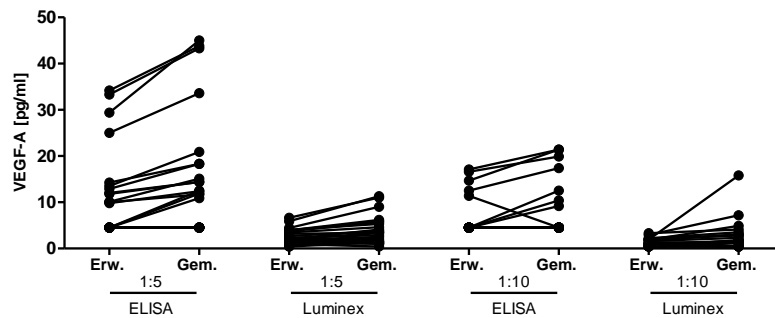
#### 4.2.3.11 VEGF-A-Spiegel von Extremwerten

Für die Verlässlichkeit eines Assays ist auch eine exakte Messung in den Randbereichen der Standardkurve wichtig. Aus diesem Grund wurden Proben, deren Konzentration durch vorherige Messung bestimmt wurde, 1:10 und 1:5 verdünnt (Messung mit ELISA und Luminex), bzw. eine bekannte Menge an rekombinantem humanem VEGF-A zugegeben (frisch rekonstituiert; Messung mit ELISA). Da die Messwerte nur vom Zentrallabor vorlagen und der Validierung der Messmethode dienten, wurden diese nicht in die lineare Regressionsanalyse mit einbezogen.

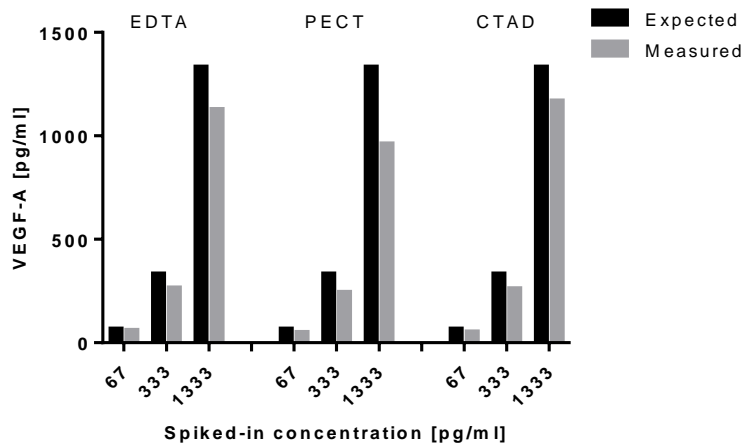
In Abbildung 55a sind die Ergebnisse der Verdünnungen aufgetragen. In den 1:10 Verdünnungen lagen die gemessenen ELISA-Werte relativ nah an den erwarteten Werten, während die Messwerte bei der 1:5 Verdünnung etwas über den erwarteten (mathematisch berechneten) Werten lagen. Die Ergebnisse der Luminex-Methode waren in beiden Verdünnungsstufen etwas höher als erwartet, allerdings lagen hier viele Messwerte unterhalb der Detektionsgrenze, weshalb sie durch den halben MDD-Wert ersetzt wurden.

Die Recovery Rate von zugegebenem VEGF-A betrug für die EDTA-Proben ca. 85 %, für die PECT-Proben 74 % und für die CTAD-Proben 83 %, insgesamt also ca. 80 % (siehe Abbildung 55b).

a)



b)



Recovery [%]	90	80	85	75	74	72	81	79	88
--------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----

**Abbildung 55:** Übersicht über gemessene VEGF-A-Extremwerte; a) Vergleich der mathematisch berechneten und gemessenen VEGF-A-Spiegel nach einer 1:5 und 1:10 Verdünnung. Sowohl der ELISA-, als auch der Luminex-Assay ergaben geringfügig höhere Messwerte als erwartet. b) Zugabe von bis zu 1333 pg/ml rekombinantes VEGF-A zu einer Plasma-Probe resultierte in einer Recovery Rate von ungefähr 80 % unabhängig vom Antikoagulans. Erw.= Erwarteter Wert (=berechnet); Gem.= Gemessener Wert.

## 4.3 Diskussion - klinischer Teil

### 4.3.1 ROP Register

Die Frühgeborenenretinopathie wurde bereits 1942 von Terry (1) beschrieben. Aufgrund der Pathophysiologie der Erkrankung (siehe Abschnitt 1.2.3) fokussierten sich die ersten Behandlungsansätze darauf, die avaskulären Bereiche der Retina zu reduzieren und dadurch eine geringere Expression angiogener Wachstumsfaktoren zu erreichen. Über 70 Jahre nach der Erstbeschreibung der Erkrankung durch Terry ist aber noch immer keine optimale Behandlungsmethode für Kinder mit Frühgeborenenretinopathie gefunden. Ein Grund hierfür liegt mitunter in der Seltenheit der behandlungsbedürftigen Stadien (3,2 % Inzidenzrate unter den Screeningfällen in Deutschland, siehe

Abschnitt 1.2.2), die es für einzelne Zentren schwierig macht, Behandlungsmöglichkeiten zu vergleichen. Aus diesem Grund wurde 2012 das Retina.net ROP Register ins Leben gerufen, um eine Plattform zu schaffen, mit deren Hilfe deutschlandweit gemeinsam Verläufe von behandelten Frühgeborenenretinopathie Fällen ausgewertet werden können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die erste Auswertung dieses Registers für den Zeitraum 2011 bis 2013 durchgeführt.

Die Inzidenzrate der Behandlungen ist mit 3,2 % vergleichbar mit dem schwedischen ROP Register (4,2 %) (297). Der Behandlungszeitpunkt in Deutschland liegt dagegen mit 6,7 Wochen postnatales Alter, bzw. 32,4 Wochen postmenstruelles Alter deutlich früher als in der schwedischen Population (12,7 Wochen PNA bzw. 37,4 Wochen PMA) und einigen anderen Studien (265, 298), jedoch nur wenig früher als in der koreanischen Population von Yoon *et al.* (299).

Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Form der Frühgeborenenretinopathie mit Komorbiditäten sowie Sauerstoffsupplementation ist bekannt (283-285, 300-302). Dies zeigte sich auch in den Registerdaten: 99 % der behandelten Patienten hatten postnatal eine Sauerstoffsupplementation erhalten, was auch mit der häufigsten Komorbidität, der Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD; bei 85 % der Kinder dokumentiert) zusammenhängt. Außerdem waren bakterielle Sepsis (60 %) und ein persistierender Ductus arteriosus (PDA; 66 %) als weitere Komorbiditäten häufig dokumentiert. In Bezug auf BPD und PDA ist dies vergleichbar mit der Verteilung der Komorbiditäten bei Chan *et al.* (286), wo 89 % der Kinder eine BPD und 67 % einen PDA aufwiesen. Dagegen zeigten in dieser Studie jedoch alle behandelten Kinder eine Sepsis in der Vorgeschichte, während dies im Register nur bei 60 % der Kinder der Fall war. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Komorbiditäten und dem Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie war in der Population des Registers nicht erkennbar. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass alle im Register dokumentierten Kinder eine schwere Form der Frühgeborenenretinopathie (es wurden ja alle Kinder mindestens in einem Auge behandelt) aufwiesen. Es bestand jedoch ein Zusammenhang zwischen Gestationsalter und dem Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie (siehe Abbildung 36c). Kinder mit einem Gestationsalter von mindestens 200 Tagen, hatten als schwersten Grad eine Zone II, 3+ Erkrankung, welches auch der insgesamt am häufigsten vorkommende Schweregrad im Register war. Eine AP-ROP (10 Augen, 5 Kinder) kam dagegen nur bei Kindern vor, die ein Gestationsalter von max. 181 Tagen hatten. Dies zeigt die gute neonatologische Versorgung in Deutschland, besonders wenn man die Fallberichte von Park *et al.* (303) betrachtet, in denen es bei deutlich älteren Kindern zur Bildung einer AP-ROP gekommen ist. Ein möglicher Grund hierfür könnten z.B. andere Sauerstoffregime sein.

Außerdem stellten wir in unserer Population einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht (wie auch Mintz-Hittner *et al.* (304)) sowie postnataler Sauerstoffsupplementation mit dem Bedarf von wiederholten Behandlungen fest. Bisher waren niedriges Geburtsgewicht und Gewichtszunahme nach der Geburt nur mit der Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie an sich in Verbindung gebracht worden (288, 305-307). Darauf basierte auch das WINROP-Tool zur Beurteilung des Risikos für eine behandlungsbedürftige Frühgeborenenretinopathie anhand der Gewichtsentwicklung (308, 309), welches jedoch durch Änderung der eingesetzten Sauerstoffregime seine Gültigkeit verloren hat (83).

Etwas ungewöhnlich erscheint im Registerdatensatz die Behandlung von vier Augen mit einer Zone III Erkrankung, die laut deutschen Guidelines (84) nicht behandlungsbedürftig wären. Die Frühgeborenenretinopathie verläuft jedoch wie viele Erkrankungen bei jedem Patienten anders und kann somit nur sehr schwer von allgemeinen Guidelines abgedeckt werden (310). So kann z.B. bilateral die Entwicklung sehr unterschiedlich verlaufen: während in einem Auge bereits eine Behandlungsbedürftigkeit besteht, kann im anderen Auge noch ein milderes Stadium vorliegen. In so einem Fall, könnte sich der Arzt dafür entscheiden, beide Augen gleichzeitig zu behandeln, um dem Kind einen zweiten operativen Eingriff unter Narkose in nur kurzem zeitlichem Abstand zu ersparen.

Die Art der Behandlung hat sich in dem vom Retina.net ROP Register untersuchten Zeitraum deutlich verändert. Zwar blieb die Laserkoagulationstherapie während des gesamten Studienzeitraums Standardtherapie, jedoch nahm die Häufigkeit der Behandlungen mit VEGF-Inhibitoren im betrachteten Kollektiv deutlich zu: 2011, dem Jahr in dem die BEAT-ROP Studiendaten veröffentlicht wurden, waren nur 7 % der Behandlungen reine VEGF-Inhibition (weitere 7 % waren eine Kombinationstherapie aus Laserkoagulation und VEGF-Inhibition). Im Jahr 2012 machten die VEGF-Inhibitoren im Register 25 %, 2013 20 % und 2014 bereits 32 % aller Behandlungen aus. Ranibizumab wurde ab 2013 an den am Register teilnehmenden Kliniken eingesetzt, obwohl es zu diesem Zeitpunkt immer noch keine prospektive, randomisierte, klinische Studie zu diesem Medikament gab. Die Dosierung der VEGF-Inhibitoren (unabhängig vom Präparat) betrug in allen im Register dokumentierten Fällen die halbe Erwachsenendosis, obwohl es bereits theoretische Überlegungen (311) und erste Daten gibt, die zeigen, dass auch eine niedrigere Dosierung ausreichend wirksam sein könnte (265, 266). Der Anstieg des Einsatzes der VEGF-Inhibitoren zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie ist von besonderem Interesse, zumal noch nicht systematisch untersucht wurde, welcher VEGF-Inhibitor am besten wirkt, in welcher Dosierung er eingesetzt werden sollte und ob es eventuell Langzeitschäden gibt (312-314).

Unter Einsatz von VEGF-Inhibitoren gab es im Register im Vergleich zur Laserkoagulation keine vermehrten Komplikationen innerhalb der ersten 24 h nach Behandlung, wie sie z.B. von Chhablani *et al.* (315) nach 16 h nach Bevacizumab-Therapie in einem Fallbericht beschrieben wurden. Leider lassen sich aus den aktuell im Register dokumentierten Daten noch keine Schlüsse auf mögliche Langzeit Komplikationen ziehen. Es wird auch noch einige Zeit dauern, bis z.B. Daten zu Refraktion mit Hilfe des ROP Registers ausgewertet werden können. Diese sind von besonderem Interesse, da bereits in einigen Fällen von einer höheren Myopie unter Laserkoagulation als unter VEGF-Inhibition berichtet wird (90, 316, 317).

Ein derzeit noch fehlender Aspekt im Register sind Daten zur kognitiven Entwicklung. Dies ist besonders im Hinblick auf die 2016 veröffentlichten Daten aus dem Kanadischen Neonatologieregister von Interesse, in denen gezeigt wird, dass Kinder, die mit Bevacizumab behandelt worden waren, im Alter von 18 Monaten deutlich mehr neurologische Entwicklungsstörungen aufwiesen, als mit Laser behandelte Kinder (101). Es sollte deshalb erwogen werden, Untersuchungen zur kognitiven Entwicklung im Register einzubauen.

Ein Punkt, der in Bezug auf den Vergleich von Laserkoagulation und VEGF-Inhibitoren bereits mit den vorhandenen Daten untersucht werden kann, sind die Raten an behandlungsbedürftigen Rezidiven. In der Gesamtpopulation des Registers kam es bei 19 % der Kinder zu wiederholten Behandlungen, wobei aus der Laserkoagulationsgruppe 21 % und aus der Gruppe der VEGF-Inhibitoren 16 % eine Wiederbehandlung benötigten. Im Vergleich dazu lagen die Wiederbehandlungsraten in der BEAT-ROP Studie bei nur 4 % in der Bevacizumab Gruppe und bei 22 % in der Laserkoagulationsgruppe (73). In der Population von Hwang *et al.* (91) kam es dagegen nur bei 3 % der mit Laser behandelten Kinder zum Bedarf einer Wiederbehandlung und bei 14 % der mit Bevacizumab behandelten Kinder. Die Wiederbehandlungsrate der BEAT-ROP Studie von nur 4 % könnte eventuell auch eine Verzerrung durch den recht frühen Endpunkt der Studie nach bereits 54 Wochen PMA sein, aufgrund dessen sehr späte Wiederbehandlungen in der Bevacizumab Gruppe möglicherweise noch gar nicht dokumentiert wurden (93). Ein Grund für die recht hohen Wiederbehandlungsraten im deutschen ROP Register könnte wiederum sein, dass sich an diesen hochspezialisierten Zentren die eher schweren Fälle gesammelt haben. In einer US Population von Kindern, die ebenfalls an einem hochspezialisierten Zentrum behandelt wurden, benötigten 18 % der Fälle eine Wiederbehandlung (318). Des Weiteren muss beim Vergleich der beiden Therapieoptionen in Bezug auf die Häufigkeit der Wiederbehandlungen beachtet werden, dass in der vom Register erfassten Patientenpopulation alle Zone I Erkrankungen und ein

Großteil der AP-ROP Fälle, also die meisten besonders schweren Fälle, mit VEGF-Inhibitoren behandelt wurden. Der Grund für den Selektionsbias der schweren Fälle in die VEGF-Inhibitionsgruppe liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass sowohl das Redaktionskomitee der deutschen Leitlinie, als auch die am Register teilnehmenden Ärzte einen potentiellen Nutzen der VEGF-Inhibition besonders für die zentralen Fälle sehen und diese Fälle trotz des Risikos einer erneuten Behandlung vermehrt mit VEGF-Inhibitoren behandelt werden.

Ein grundlegender Unterschied zwischen den beiden Behandlungsoptionen besteht in der Zeit, die zwischen Initial- und Wiederbehandlung liegt. Bei Laserkoagulation kam es im Register bei Rezidiven im Durchschnitt nach 3,8 Wochen zu einer Wiederbehandlung, während bei den VEGF-Inhibitoren 10,4 Wochen zwischen initialer und Rezidiv-Behandlung lagen. Es gibt sogar einzelne Fallberichte, die ein Wiederaufflammen der Frühgeborenenretinopathie ein Jahr nach Injektion beschreiben (92). Dies muss besonders dann, wenn die Kinder aus dem Krankenhaus und damit auch aus den regelmäßigen Kontrollen entlassen werden, Beachtung finden und stellt eine Herausforderung für das Follow-Up dieser Kinder dar.

### **4.3.2 Beantwortung der noch offenen Fragen mit Hilfe der CARE-ROP Studie?**

Mit den Daten aus dem Frühgeborenenretinopathie Register kann der Status Quo der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland gut dargestellt werden. Außerdem liefert es Antworten auf viele bisher offene Fragen, z.B. welche VEGF-Inhibitoren in Deutschland derzeit eingesetzt werden und bei welchen Stadien welche Behandlungsoption bevorzugt wird. Jedoch kann eine nicht-interventionelle Studie, wie sie das Register darstellt, bestimmte Fragen nicht systematisch beantworten. So bleiben unter anderem noch folgende Fragen ungeklärt:

- Welche Behandlungsoption ist für welches Stadium am besten geeignet?
- Welches Medikament ist das richtige?
- In welcher Dosierung sollte es eingesetzt werden?
- Wie stark ausgeprägt sind die Auswirkungen einer intravitrealen Behandlung mit VEGF-Inhibitoren auf die systemischen VEGF-Spiegel?
- Wie sehen die Langzeitverläufe nach der Behandlung aus?
- Gibt es Langzeitschäden?

Gerade da die VEGF-Inhibitoren, wie auch das Register zeigt, immer häufiger angewendet werden, ist es wichtig, auf möglichst viele dieser Fragen in naher Zukunft eine Antwort zu finden. Die CARE-ROP Studie möchte als eine der ersten prospektiven, randomisierten, klinischen Prüfungen zu Ranibizumab bei Frühgeborenenretinopathie Antworten finden auf Fragen zu Wirksamkeit und Sicherheit zweier verschiedener Dosierungen von Ranibizumab. Im Rahmen des Follow-Up Zeitraums wird sie auch Langzeitergebnisse zur VEGF-Inhibition liefern. Jedoch wird auch die CARE-ROP Studie allein nicht auf alle bisher unbeantworteten Fragen eine Antwort liefern können.

#### 4.3.3 Design der CARE-ROP Studie

Bei der CARE-ROP Studie handelt es sich um die erste randomisierte, doppelblinde klinische Studie, in der Ranibizumab zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie eingesetzt wurde. Die einzige große randomisierte Studie, in der zuvor ein VEGF-Inhibitor verwendet wurde, war die BEAT-ROP Studie (73), in der Bevacizumab zum Einsatz kam. Bevacizumab ist jedoch weder bei Erwachsenen noch bei Kindern für die intravitreale Anwendung, sondern zur systemischen Behandlung verschiedener Tumore zugelassen. Außerdem unterscheiden sich die verschiedenen VEGF-Inhibitoren in ihrer Pharmakokinetik sowohl intraokular, aber vor allem auch im systemischen Kreislauf (95, 142, 246, 268) (siehe hierzu auch Abschnitt 1.3.2). Bevacizumab hat eine etwas längere okuläre Verweildauer, jedoch besonders die Zeit, in der es sich in der Blutbahn befindet und die systemischen VEGF-Spiegel unterdrückt, ist deutlich länger im Vergleich zu Ranibizumab. Besonders in der sehr vulnerablen Population der Frühgeborenen, bei denen sich der Organismus noch im Wachstum befindet und VEGF noch viele verschiedene Funktionen einnimmt, könnte dies zu Problemen führen. Aus diesen Gründen, wurde die CARE-ROP Studie mit Ranibizumab statt mit Bevacizumab durchgeführt.

Daten aus einem Tiermodell zur Frühgeborenenretinopathie von Luty *et al.* gaben Hinweise darauf, dass eine geringere Dosierung eines VEGF-Inhibitors (im Tiermodell wurde Aflibercept eingesetzt) im Vergleich zu höheren Dosierungen zu einer weiter reichenden Revaskularisierung der Retina führen kann (267). Selbst mit der niedrigsten eingesetzten Konzentration konnte die Bildung von Neovaskularisationen fast vollständig verhindert werden. Außerdem gab es bereits erste klinische Fallberichte, die die Wirksamkeit von niedrigeren Dosierungen als die halbe Erwachsenendosis zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zeigten (265, 319). Aus den präklinischen und klinischen Daten resultierten die beiden Konzentrationen 0,12 mg und 0,20 mg der CARE-ROP Studie, die mit 24 % und 40 % der Erwachsenendosis beide unter der sonst üblichen halben Erwachsenendosis liegen. Kinder, die bereits

## Klinische Aspekte

mit einer einmaligen Applikation der niedrigen Dosierung ausreichend behandelt werden konnten, erhielten durch die in der CARE-ROP Studie angewendeten niedrigen Dosierungen keine Überdosierung an VEGF-Inhibitor. Dagegen konnten Kinder, die z.B. eine besonders aggressive Form aufwiesen, mit multiplen Behandlungszyklen einer niedrigen Dosierung potentiell besser behandelt werden, als mit einer einmaligen Hochdosisapplikation. Bei diesen Kindern konnte mit dem in der CARE-ROP Studie angewendeten Vorgehen die notwendige Menge austitriert werden, ohne eine systemische Belastung durch Überbehandlung mit VEGF-Inhibitoren in Kauf zu nehmen. Der gewählte Abstand von mindestens 28 Tagen war angelehnt an die bei Erwachsenen etablierten Behandlungsschemata.

Der primäre Endpunkt der CARE-ROP Studie wurde, wie in der BEAT-ROP Studie (73), auf 24 Wochen nach der initialen Injektion gelegt. Dadurch sollten diese beiden Studien vergleichbarer werden. Um Patienten, bei denen es erst später zu einem Wiederaufflammen der Erkrankung kommt, noch im Rahmen der Studie zu dokumentieren, folgt auf die Kernstudie ein Follow-Up Zeitraum von insgesamt fünf Jahren, während dem drei Untersuchungstermine geplant sind. Mit diesem langen Follow-Up können unter anderem auch Langzeitverläufe und Visusergebnisse, sowie kognitive Ergebnisse nach VEGF-Inhibition erfasst werden. Die pädiatrische 5-Jahres Nachkontrolle erfolgt dabei in Kooperation mit dem GNN, sodass hier die Vergleichbarkeit zu einer großen deutschlandweiten Kohortenstudie gegeben sein wird und die kognitiven Langzeitergebnisse der CARE-ROP Studienpatienten mit denen anderer Patienten, die z.B. mit Bevacizumab oder Laserkoagulation behandelt wurden, verglichen werden können.

Ein Kritikpunkt, den man an der CARE-ROP Studie äußern könnte, ist die Tatsache, dass die Rekrutierung sehr langsam verlief und in der geplanten Rekrutierungszeit von zwei Jahren „nur“ 19 Patienten eingeschlossen werden konnten. Um auf die initial geplanten 40 Patienten zu kommen, hätte die Rekrutierungszeit somit nochmal deutlich verlängert werden müssen, wogegen man sich entschieden hat.

### **4.3.4 Sicherheitsdaten betrachtet durch das DSMB**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sicherheitsdaten, welche zum Zeitpunkt der DSMB Bewertung am 09. März 2016 vorlagen, sowie die wichtigsten Baselinedaten der ersten 13 Kinder, die in die Studie eingeschlossen worden waren, ausgewertet.



In Bezug auf die Baselinecharakteristika Geburtsgewicht, Gestationsalter und Geschlechterverteilung waren die bisher betrachteten Patienten gleichmäßig (die vorhandenen Unterschiede waren nicht statistisch signifikant) auf die beiden Behandlungsarme (0,12 mg vs. 0,20 mg) der CARE-ROP Studie verteilt. Das Geburtsgewicht lag über alle Kinder gesehen bei 600 g, also etwas leichter als z.B. in der BEAT-ROP Studie (Geburtsgewicht aller Kinder ca. 660 g (73)) oder dem ROP Register (mittleres Geburtsgewicht ca. 690 g), während das Gestationsalter mit 24,9 Wochen etwas über den Kindern aus der BEAT-ROP Studie (24,4), jedoch unter den Daten des Registers (25,3) lag. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Kinder, die in die CARE-ROP Studie eingeschlossen wurden, für ihr Gestationsalter besonders klein waren (engl. small for gestational age, SGA), und somit auf eine Selektion von eher schwereren Fällen. Im Gegensatz zum Register, in dem etwas mehr weibliche Patienten, als männliche behandelt wurden, sind derzeit knapp 62 % der CARE-ROP Patienten männlich, was vergleichbar mit der BEAT-ROP Studie ist (65 %). Insgesamt muss man beachten, dass zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Dissertation nur Baselinedaten von 13 Kindern vorlagen, wodurch diese Aspekte noch nicht abschließend bewertet werden können.

Für die Bewertung durch das DSMB waren nur die Re-Injektions- und Rescuefälle, sowie die gemeldeten schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse, inklusive der vorgekommenen Todesfälle einbezogen worden. Bei Betrachtung der CARE-ROP Re-Injektionsfälle muss betont werden, dass die CARE-ROP Studie bis dato die einzige Studie ist, in der Re-Injektionen derselben Dosierung im Prüfprotokoll explizit erlaubt waren, weshalb ein Vergleich mit den, in der Literatur bislang veröffentlichten Daten schwierig ist. Zusätzlich liegen beide in der CARE-ROP Studie eingesetzten Dosierungen unter der sonst meist eingesetzten halben Erwachsenenendosis (73, 320). Dennoch konnten in der CARE-ROP Studie 69 % aller Kinder mit nur einer einmaligen Injektion ausreichend behandelt werden und es benötigten bis zur Bewertung durch das DSMB nur zwei Augen (verteilt auf beide Behandlungsarme) eine Rescue-Behandlung. Eine Re-Injektion erfolgte in sechs der 26 behandelten Augen (23 %). Diese Wiederbehandlungsrate lässt sich mit dem ROP Register vergleichen, wo 21 % (8 von 38 Augen) in der primär mit VEGF-Inhibitoren behandelten Gruppe erneut behandelt wurden. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass im Register meist Bevacizumab, anstelle von Ranibizumab verwendet wurde und die erste Wiederbehandlung im Register bei allen Kindern in Form einer Laserkoagulation erfolgte. Bei einer Laserkoagulation zur Wiederbehandlung wird die periphere Netzhaut, die zu diesem Zeitpunkt immer noch nicht vaskularisiert ist, zerstört, sodass VEGF nicht mehr weiter produziert werden kann. Mit einer erneuten Injektion eines VEGF-Inhibitors wird die Netzhaut nicht zerstört, wodurch es weiterhin zu

## Klinische Aspekte

einer VEGF Produktion kommen kann. Dies erschwert somit den Vergleich der Rate für eine zweite Wiederbehandlung. Dennoch waren die Raten für eine zweite Wiederbehandlung mit 33 % (2 von 6 Augen) in der CARE-ROP und 37,5 % (3 von den 8 wiederbehandelten Augen) im Register sehr ähnlich.

In einigen Fällen kann durch Verwendung eines VEGF-Inhibitors sogar eine Vaskularisation der Peripherie weit über die bisherige Leiste hinaus erreicht werden (73). Allerdings gibt es mittlerweile erste Daten, die zeigen, dass die Vaskularisierung der Retina nach VEGF-Inhibition (in den bisher bekannten Studien Bevacizumab in 40 % bzw. 50 % der Erwachsenenendosierung) nicht normal verläuft und sich auch nicht immer bis zur Ora serrata erstreckt (87-89, 320). Ob dies auch unter Ranibizumab-Einsatz in den niedrigen Dosierungen der CARE-ROP Studie der Fall ist, werden die Nachuntersuchungen zeigen.

In der CARE-ROP Studie wird nur Ranibizumab eingesetzt, welches noch nie im direkten Vergleich in einer prospektiven, randomisierten Studie mit Bevacizumab bei der Therapie der Frühgeborenenretinopathie angewendet wurde. Die Einschlusskriterien der CARE-ROP Studie sind bewusst nahe am Protokoll der BEAT-ROP Studie angelehnt, um die beiden Studien möglichst gut miteinander vergleichen zu können. In beiden Studien wurden Patienten mit Zone I oder posteriorer Zone II Erkrankung eingeschlossen – eine Verzerrung aufgrund besonders schwerer Fälle sollte es somit zwischen den beiden Studien nicht geben. Dennoch waren die Re-Injektionsraten in der BEAT-ROP Studie deutlich niedriger. Um dies abschließend bewerten zu können, muss die Endauswertung der CARE-ROP Studie abgewartet werden. Erst dann wird deutlich, ob die Patientenkollektive der beiden Studien tatsächlich in Bezug auf die Schweregrade der Erkrankung vergleichbar sind. Bisher gibt es nur retrospektive Untersuchungen, in denen die beiden Medikamente verglichen wurden. Chen *et al.* (321) zeigen in einer Fallserie von 37 Patienten, dass sowohl Ranibizumab, als auch Bevacizumab wirksam sind, die ROP zurück zu drängen, wobei hier Bevacizumab im Alter von einem Jahr zu einer höheren Rate an Myopie führte.

Die Information, welches Stadium der Frühgeborenenretinopathie zu Beginn der Therapie vorlag und wie es sich nach Therapie bis zur Re-Injektion entwickelt hat, wurde zwar im CRF dokumentiert, lag bei Erstellung dieser Dissertation jedoch nicht vor. Dabei handelt es sich um wichtige Informationen, die sicherlich weiter Aufschluss über die tatsächliche Wirksamkeit der beiden niedrigen Dosierungen geben werden.

Ein großes Problem stellen behandlungsbedürftige, späte Rezidive dar. So benötigten die Kinder bei Hu *et al.* im Durchschnitt nach 14,4 Wochen eine Wiederbehandlung nach der initialen Bevacizumab

Monotherapie (287), bei Mintz-Hittner *et al.* sogar nach 16,2 Wochen (304). In der CARE-ROP Studie kam es im Schnitt zur ersten Re-Injektion nach zehn Wochen und vier Tagen (im Register lagen zehn Wochen und drei Tage zwischen der initialen Injektion und der ersten Wiederbehandlung). Zu diesem Zeitpunkt wird das Kind im Rahmen einer Studie zwar meist noch kontrolliert, aber da die Kinder außerhalb dieser besonderen Situation zu diesem Zeitpunkt oft bereits aus dem Krankenhaus entlassen sind (322) und die Kontrollen damit teilweise beim Hausaugenarzt stattfinden, kann dies problematisch werden.

Neben der Anzahl an Re-Injektionen und Rescue-Behandlungen wurden auch die Art und Häufigkeit der aufgetretenen unerwünschten Ereignisse bei der Bewertung durch das DSMB betrachtet. Es traten nur bei drei Kindern keine schweren unerwünschten Ereignisse auf. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den extrem frühgeborenen Kindern, die in der CARE-ROP Studie eingeschlossen wurden, um eine Patientenpopulation handelt, die multimorbide ist (siehe auch Abschnitt 1.2.1 und (39)). Ein Kind war an einer Sepsis verstorben. Sepsis ist eine bekannte Komplikation einer Frühgeburt (323), wobei sie umso häufiger auftritt, je jünger ein Kind bei Geburt ist und in 7 % der Fällen zum Tod führt (324). Beim zweiten Todesfall lag ein akutes Nierenversagen vor, welches wahrscheinlich als Folge eines Leberversagens entstand. Dieses Kind hatte über längere Zeit parenterale Ernährung benötigt, die bekanntlich in 40-60 % der Fällen mit einem Leberversagen einhergeht (325). Beide Todesfälle sind somit aufgrund der Frühgeburtlichkeit erklärbar, und stehen nicht im kausalen Zusammenhang mit der Ranibizumab Therapie. Auch bei den anderen Ko-Morbiditäten, die aufgetreten waren, waren keine für Frühgeborene ungewöhnlichen Erkrankungen (39) und außerdem wurde keines der Ereignisse von den behandelnden Neonatologen oder den Ophthalmologen mit dem Medikament in Verbindung gebracht.

Basierend auf den derzeit vorliegenden Daten der CARE-ROP Kernstudie wurde kein Sicherheitsaspekt gesehen, der für einen Abbruch der Studie oder einer der beiden Arme gesprochen hätte. Einen Unterschied in Bezug auf die Sicherheit scheint es nach aktuellem Stand zwischen den beiden niedrigen Dosierungen nicht zu geben, jedoch muss die Endauswertung der CARE-ROP Kernstudie abgewartet werden. Auch die Messungen der Plasma Proben müssen noch abgewartet werden, um die Auswirkung auf die systemischen VEGF-Spiegel der wiederholten Applikation beurteilen zu können.

#### **4.3.5 VEGF-A-Messmethodikprojekt**

Es ist bekannt, dass die intravitreale Behandlung mit VEGF-Inhibitoren beim Erwachsenen und auch bei Frühgeborenen Einfluss auf die systemischen VEGF-Spiegel hat (74, 94, 95, 98, 326). Vor kurzem wurde jedoch veröffentlicht, dass die Laserkoagulationstherapie ebenfalls zu einem Absinken der systemischen

VEGF-A-Spiegel führt (99, 327). Wie unter 1.1.2 dargestellt, hat der Wachstumsfaktor VEGF gerade bei den noch in der Entwicklung befindlichen Frühgeborenen eine große Bedeutung für die Entwicklung unter anderem der Lunge und des Gehirns und die Auswirkungen einer lang andauernden VEGF-A-Spiegelabsenkung sind nicht bekannt. Es gibt allerdings erste Berichte, die zeigen, dass mit Bevacizumab behandelte Kinder bei neurologischen Untersuchungen möglicherweise schlechter abschneiden, als mit Laser behandelte Kinder (100, 101). Besonders unter diesem Aspekt sollte eine Einflussnahme auf die systemischen Spiegel selbstverständlich vermieden werden. In der BEAT-ROP Studie wurden die VEGF-Spiegel nicht gemessen, was auch als großer Mangel an der Studie gesehen wird (97). In der CARE-ROP Studie waren deshalb von Anfang an systemische VEGF-A-Spiegelmessungen vorgesehen.

Beim Blick in die Literatur wird rasch klar, dass VEGF-A-Spiegelmessungen in vielen Bereichen der Medizin eine große Rolle spielen, die gemessenen Absolutwerte jedoch enorm variabel sind. Der Grund für diese starken Schwankungen liegt wohl darin, dass die angewandten Messmethoden sich stark zwischen den einzelnen Studien unterscheiden: So sind Daten von systemischen VEGF-Spiegeln publiziert, die in Serum oder Plasma (272-275) unter Verwendung verschiedener Antikoagulantien (EDTA (277), CTAD (95), Heparin (276) oder anderes Plasma (273)) gemessen wurden.

Um für die CARE-ROP Studie ein Standardverfahren zu etablieren, haben wir verschiedene Parameter auf ihren unabhängigen Einfluss auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel hin untersucht. Die folgenden Parameter zeigten sich, als unabhängige beeinflussende Faktoren: Messzentrum, Art des Antikoagulans, Messmethode, Art der Zentrifuge und Geschlecht des Probanden.

Obwohl an allen Zentren dasselbe Batch des ELISA-Kits verwendet wurde, variierten die aus denselben Aliquots gemessenen Werte zum Teil enorm. Dies mag zum einen an der Erfahrung der Person, die die Messung durchführte, liegen, aber auch die unterschiedlichen Spektrophotometer zur Auswertung der Farbintensität könnten hierbei eine Rolle spielen. Dieses Ergebnis machte jedoch klar, dass selbst wenn alle anderen Parameter identisch gehalten werden, wie es bei der Messung von Aliquots derselben Blutprobe der Fall ist, die Messwerte unterschiedlicher Zentren nicht vergleichbar sind und somit nur durch Messung aller Proben in einem Zentrallabor die Werte miteinander verglichen werden können. An den Mess- und Blutentnahmezentren sowie am Zentrallabor wurden alle Proben mittels ELISA vermessen. Zusätzlich erfolgte eine Luminex-Messung am Zentrallabor. Beim Vergleich der beiden Messmethoden stellten wir fest, dass die Luminex-Ergebnisse deutlich niedriger lagen, als die Werte derselben Aliquots gemessen mit ELISA. Der Scatterplot und der Bland-Altman Plot zeigten jedoch die

gute Korrelation der Werte. Allerdings lagen die Absolutwerte des Luminex immer bei ca. 27 % des ELISA-Messwertes, obwohl bei beiden Methoden bei jeder Messung Standardkurven erstellt wurden. Um zu überprüfen, ob sich die im Kit enthaltenen Standardproteine möglicherweise unterscheiden, wurde für beide Verfahren eine Standardkurve mit dem jeweils anderen Protein erstellt. Tatsächlich resultierte das im ELISA-Kit enthaltene Protein in beiden Messmethoden in einer niedriger verlaufenden Standardkurve, was wiederum die Erklärung für die niedrigeren Absolutwerte der Luminex-Messmethode ist. Für die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  ist das Phänomen, dass ELISA und Luminex unterschiedliche Ergebnisse liefern bereits bekannt (328).

VEGF-A wird unter anderem in Thrombozyten gespeichert. Da für die CARE-ROP Studie freies VEGF-A gemessen werden sollte, musste daher eine Thrombolyse während der Probenaufbereitung möglichst vollständig vermieden werden. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten Antikoagulantien (EDTA, PECT und CTAD). Während PECT und CTAD die Thrombozytenaktivierung größtenteils unterbanden, was man an den niedrigen PF-4-Spiegeln erkennen konnte, war dies unter Verwendung von EDTA nicht der Fall, was in höheren VEGF- und PF-4-Spiegeln in EDTA-Plasma resultierte. Die beiden Antikoagulantien PECT und CTAD liefern somit wahrscheinlich eher den wahren Wert des freien VEGF-A, während in den EDTA-Proben die Werte aufgrund des von den Thrombozyten abgegebenen VEGF-A deutlich höher liegen. Diese Ergebnisse sprachen, analog zu den Ergebnissen von Zimmermann *et al.* (329) für die Verwendung von PECT- oder CTAD-Plasma zur Bestimmung der systemischen VEGF-A-Werte. Auch die Experimente zur Messung von rekombinantem VEGF-A in PBS, welches mit EDTA, PECT oder CTAD versetzt war, zeigten keine negativen Auswirkungen der Antikoagulantien auf den ELISA-Assay. Da das Antikoagulans PECT nicht käuflich erwerblich ist, CTAD Monovetten® dagegen schon, wurden für die CARE-ROP Studie CTAD Entnahmeröhrchen aus den CTAD Monovetten® steril hergestellt.

Da das VEGF-A-Messmethodikprojekt als Vorprojekt für die CARE-ROP Studie aufgesetzt worden war, wurde auch untersucht, ob eine Blutabnahme unter Verwendung der Neonatalkanüle zu anderen VEGF-A-Werten führt, als unter Verwendung von Butterfly Kanülen. Wie in der Studie von Starlinger *et al.* (271), in der die Venflon Kanüle mit dem Vacutainer Butterfly System verglichen wurden, fanden auch wir keinen Einfluss der Kanüle auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel. Der Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel ist bereits bekannt (278): Je höher die Geschwindigkeit, desto niedriger sind die resultierenden Messwerte, wahrscheinlich aufgrund einer besseren Trennung der Thrombozyten vom Plasma. Wir haben in unserer Studie zwei Rotorentypen

## Klinische Aspekte

unter Verwendung vergleichbarer Einstellungen (resultierend in den gleichen Zentrifugalkräften) untersucht: den Ausschwenkrotor und den Feststellrotor. Trotz gleicher Zentrifugalkräfte unterschieden sich die VEGF-A-Spiegel signifikant zwischen den beiden Zentrifugenarten, wobei die Werte der Ausschwenkrotor Proben niedriger waren, als die der Feststellwinkelrotor Proben. Auch die PF-4-Werte unterschieden sich in gleicher Weise, was dafür spricht, dass auch in diesem Fall die vermehrte Thrombozytenaktivierung durch die stärkeren Scherkräfte im Feststellwinkelrotor zu den höheren VEGF-A-Spiegeln führte.

Die VEGF-A-Spiegel der verschiedenen Messzeitpunkte unterschieden sich analog zu Svendsen *et al.* (278) kaum im Verlauf einer Woche. Dies unterstreicht nicht nur die Verlässlichkeit der Blutabnahme und Messmethoden, sondern zeigt auch die Stärke der Effekte der beeinflussenden Parameter.

Mit unserer systematischen Untersuchung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel konnten wir Parameter identifizieren, die standardisiert werden müssen, um verlässliche und reproduzierbare VEGF-A-Ergebnisse in klinischen Studien zu erhalten. Für die CARE-ROP Studie ergab sich aus dieser Vorstudie ein Protokoll (siehe Anhang Abbildung 61), welches an allen Zentren standardisiert angewendet wurde: unter anderem beinhaltet es die Verwendung von CTAD als Antikoagulans, sowie derselben Zentrifuge (nach Möglichkeit Ausschwenkrotor) im Verlauf der gesamten Studie. Gemessen wurden die Proben gesammelt am Ende der Studie von einem Zentrallabor.

### 4.4 Zusammenfassung klinischer Teil

Das Retina.net ROP Register ist ein sehr wichtiges und hilfreiches Tool, um bestimmte Fragestellungen zu beantworten: So nahm in den letzten Jahren der Einsatz von VEGF-Inhibitoren zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie immer mehr zu und auch Ranibizumab wurde bereits in Deutschland eingesetzt. Der Vergleich zwischen den beiden Präparaten ist jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich. In Bezug auf die Komplikationen, die im zeitlichen Zusammenhang mit der Behandlung auftraten, sowie der Anästhesiemethoden scheint die VEGF-Inhibitionstherapie der Laserkoagulation überlegen. Dagegen ist der Zeitpunkt des Wiederauftretens der Erkrankung nach Einsatz von VEGF-Inhibitoren problematischer als unter Laserkoagulation.

Einige wichtige Fragen zum Einsatz der VEGF-Inhibition bei der Frühgeborenenretinopathie können mit einem nicht-interventionellen Register nicht beantwortet werden und bleiben somit weiterhin offen. Die klinische Studie CARE-ROP wurde daher als Proof of Concept Studie konzipiert, um zu überprüfen, ob

Ranibizumab für die Behandlung der Frühgeborenenretinopathie in niedrigen Dosierungen sicher und wirksam ist. Mit den für diese Dissertation vorliegenden Daten kann die Frage nach der Effektivität und Sicherheit nur teilweise beantwortet werden. Hierzu muss auf die Endauswertung, in der alle in der CARE-ROP erhobenen Daten zur Verfügung standen, verwiesen werden (76).

Die bisher vorliegenden und ausgewerteten Daten sprechen dafür, dass die Anwendung von Ranibizumab auch in diesem vulnerablen Patientenkollektiv zumindest kurzfristig gesehen keine Schäden hervorruft und dazu geeignet ist, die Frühgeborenenretinopathie zurück zu drängen solange beachtet wird, dass Nachkontrollen über eine längere Zeit nötig sind, bis die komplette Retina vaskularisiert ist und möglicherweise sogar darüber hinaus. In puncto Sicherheit und Wirksamkeit bleiben die Langzeitergebnisse abzuwarten, die weiterführende Informationen liefern werden. Auf diese Ergebnisse muss jedoch noch mind. zwei bzw. fünf Jahre gewartet werden, da erst bei der zwei Jahres Follow-Up Visite die Ergebnisse des Bayley-Tests vorliegen werden. Bei der fünf Jahres Follow-Up Untersuchung wird durch den Zusammenschluss mit dem German Neonatal Network (GNN) für die Nachuntersuchung ein Vergleich des Patientenkollektivs der CARE-ROP Studie mit dem großen Datensatz des GNN möglich. Hierbei sind auch wichtige Erkenntnisse über die Langzeitsicherheit von Ranibizumab bei der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zu erwarten. Zusätzlich lieferten auch die standardisierten Messungen der VEGF-Spiegel, die in der Gesamtpublikation enthalten sind, wichtige Daten zu den systemischen Einflüssen der beiden Dosierungen.





## 5 Fazit – Beantwortung der Forschungsfragen und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen mehrerer präklinischer und klinischer Projekte verschiedene Aspekte der Wirksamkeit und Sicherheit von VEGF-Inhibition bei der Frühgeborenenretinopathie zu untersuchen. Dabei zeigt das ROP Register, dass die VEGF-Inhibition in Deutschland immer häufiger zur Therapie einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie eingesetzt wird, obwohl bislang kein VEGF-Inhibitor für diese Erkrankung zugelassen ist. Dies kann als Beleg für die Notwendigkeit dieser Untersuchungen gewertet werden.

Um den Einfluss einer VEGF-Inhibition auf die neuro-vaskuläre Interaktion zu untersuchen, wurde im präklinischen Teil dieser Arbeit ein Modell für das neuro-vaskuläre Interface etabliert. Hier gibt es noch einige Aspekte, die vor einer weiteren Verwendung des Modells untersucht werden müssen, wie z.B. die Agilität der neuronalen Zellen unter dem Endothelzellsphäroidgel oder die Zusammensetzung des durch die neuronalen Zellen konditionierten Mediums. Dennoch konnte bereits jetzt mit diesem Modell herausgefunden werden, dass die VEGF-Inhibition einen hemmenden Einfluss auf die Interaktion von neuronalen und endothelialen Zellen hat. Ein Aspekt, der in Zukunft hier noch detaillierter untersucht werden sollte, ist der direkte Einfluss der VEGF-Inhibition auf die neuronalen Zellen.

Der Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf das miRNA Profil von Zellen, die unter anderem an der Entstehung von Neovaskularisationen beteiligt sind, war bisher ebenfalls noch nicht untersucht worden. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das miRNA Profil von HRMVECs charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine unterschiedliche Beeinflussung des miRNA Profils durch die drei verwendeten VEGF-Inhibitoren resultierte. Ein Unterschied bestand aber zwischen Zellen unter Hungerbedingung und angiogener Stimulation, was belegt, dass miRNA Veränderungen eine Rolle bei der Aktivierung endothelialer Zellen der Netzhaut spielen. Die zwischen Hungerbedingung und der angiogenen Stimulation veränderten miRNAs waren in OIR-Tieren im Vergleich zu NOIR-Tieren allerdings nicht verändert, was möglicherweise auf die Tatsache zurück zu führen ist, dass *in vivo* globale Veränderungen der Netzhaut und nicht isolierte Endothelzellen untersucht wurden. Auch eine VEGF-Inhibition hatte *in vivo* keinen Einfluss auf die Expression dieser miRNAs. Einer der hier noch fehlenden Aspekte ist der Zeitverlauf der miRNA Expression mit und ohne VEGF-Inhibition, der mittels Sequenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden sollte.

Im ersten Teil der klinischen Projekte wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand einer Registerstudie die Art der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland analysiert. Es zeigte sich, dass im

Im klinischen Alltag nimmt der Einsatz von VEGF-Inhibitoren zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie immer mehr zu. Gleichzeitig stellt aber immer noch die Laserkoagulation die Standardtherapie der therapiebedürftigen Frühgeborenenretinopathie dar. Unter den VEGF-Inhibitoren wurde Bevacizumab am häufigsten zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie eingesetzt, mit einem über die Zeit zunehmenden Anteil von Ranibizumab. Aflibercept wurde nach Stand der Registerdaten an den teilnehmenden Kliniken nicht zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie verwandt. Beim Vergleich von Lasertherapie und VEGF-Inhibition in Bezug auf den Zeitpunkt des Rezidivs einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie fällt auf, dass die gelaserten Kinder im Mittel früher ein Wiederauftreten der Erkrankung haben als mit VEGF-Inhibitoren behandelte Kinder. Daraus folgt die Notwendigkeit, nach VEGF-Inhibition sehr lange Nachkontrollphasen für behandelte Kinder zu fordern, um keine späten Rezidive einer behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie zu verpassen. Auch wenn diese und zukünftig folgende Auswertungen von Registerdaten viele wertvolle Erkenntnisse zu Langzeitverläufen und notwendigen Therapienachkontrollen liefern, können nicht-interventionelle Studien bei weitem nicht alle Fragen zur neuen Therapieoption der VEGF-Inhibition bei der Frühgeborenenretinopathie beantworten. Es ist daher wichtig, VEGF-Inhibitoren darüber hinaus im Rahmen von kontrollierten, randomisierten klinischen Studien bezüglich ihres Stellenwertes in der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zu untersuchen.

In der im Rahmen dieser Dissertation konzipierten und betreuten klinischen Studie CARE-ROP wurde Ranibizumab erstmals in einer prospektiven randomisierten Studie in zwei verschiedenen niedrigen Dosierungen zu Sicherheit und Effektivität in der Therapie der Frühgeborenenretinopathie untersucht. Die bisher vorliegenden Sicherheitsdaten zeigten keine Auffälligkeiten in Bezug auf die aufgetretenen Nebenwirkungen in beiden Behandlungsarmen. Bei beiden Dosierungen waren nur wenige Rescue-Behandlungen nötig, was für die Wirksamkeit von Ranibizumab auch in den niedrigen Dosierungen spricht. Allerdings muss hier die Abschlussauswertung abgewartet werden, in der unter anderem die Wirksamkeit bewertet werden wird. Die VEGF-Plasmaspiegel werden auch Teil dieser Auswertung sein, sodass auch der systemische Einfluss der beiden Dosierungen in standardisierter Weise verglichen werden kann.

Eine Frage, die auch durch die CARE-ROP Studie nicht beantwortet werden kann, ist die Frage nach der Wahl der bestmöglichen Therapieoption (Laser oder VEGF-Inhibition), da diese Studie nicht über einen Laserarm verfügt. Um diese Frage beantworten zu können, müsste eine prospektive, randomisierte Studie durchgeführt werden, in der Ranibizumab mit Laserkoagulation verglichen wird. Systemische

VEGF-Messungen und ein langer Nachkontrollzeitraum, in dem die geistige und motorische Entwicklung der behandelten Kinder untersucht werden, müssten in einer solchen Studie selbstverständlich integriert werden. Nur durch den direkten Vergleich der verschiedenen Therapioptionen in einer prospektiven klinischen Studie könnte abschließend geklärt werden, welche Therapie in welchem Stadium der Frühgeborenenretinopathie am besten für die Behandlung geeignet ist.



## 6 Zusammenfassung

Betrachtet man die Erfolge, die mit VEGF-Inhibitoren bei der Behandlung verschiedener vasoproliferativer Erkrankungen, wie der AMD oder dem DMÖ, erreicht wurden, ist es kaum verwunderlich, dass der Einsatz dieser Medikamentenklasse in den letzten Jahren auch bei der Frühgeborenenretinopathie deutlich zugenommen hat. Dennoch ist bis heute noch kein VEGF-Inhibitor für die Therapie dieser vasoproliferativen Erkrankung bei Kindern zugelassen.

Ziel dieser Arbeit war es, in mehreren präklinischen und klinischen Teilprojekten wichtige Aspekte zu Sicherheit und Wirksamkeit der VEGF-Inhibition bei der Therapie der Frühgeborenenretinopathie zu untersuchen. Da es sich bei Frühgeborenen um ein sehr vulnerables Patientenkollektiv handelt, ist der Erkenntniszugewinn hier besonders wichtig.

Im präklinischen Teil wurde der Einfluss einer VEGF-Inhibition auf das neuro-vaskuläre Interface sowie das miRNA Expressionsprofil retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen untersucht. Dabei wurde das neuro-vaskuläre Interface durch die Interaktion primärer retinaler neuronaler Zellen mit HUVEC Sphäroiden dargestellt und miRNA Profile humaner retinaler mikrovaskulärer Zellen durch Sequenzierung der kleinen nicht codierenden RNA-Sequenzen bestimmt. Die *in vitro* unterschiedlich exprimierten miRNAs wurden *in vivo* im Oxygen Induced Retinopathy Modell, welches häufig als Modell der Frühgeborenenretinopathie eingesetzt wird, sowie funktionell in einem Sphäroidassay untersucht.

Es zeigte sich, dass in dem in dieser Arbeit etablierten Modell für das neuro-vaskuläre Interface die neuronalen Zellen proangiogen auf HUVEC Sphäroide wirken, die *in vivo* Situation diesbezüglich also in das Modell übertragbar war. Die induzierte Sprossung konnte durch VEGF-Inhibition signifikant verringert, jedoch nicht komplett auf Basalniveau gesenkt werden, was für die Anwesenheit weiterer angiogener Faktoren neben VEGF-A in der Ko-Kultur spricht. Die Untersuchung des miRNA Profils von HRMVECs zeigte, dass der größte Unterschied im Expressionsprofil zwischen Hungerbedingung und der angiogenen Stimulation zu sehen war, während die Anwesenheit der verschiedenen verwendeten VEGF-Inhibitoren keine relevanten Veränderung bewirkte. Die Ergebnisse aus den *in vitro* Versuchen der Endothelzellkulturen ließen sich nicht eins zu eins auf die *in vivo* Situation übertragen. Vielmehr finden *in vivo* wesentlich komplexere Vorgänge statt, die *in vitro* nur in Ausschnitten modelliert werden können.

Im klinischen Teil wurde der Status Quo der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie in Deutschland anhand von Registerdaten analysiert. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die klinische, interventionelle Studie CARE-ROP, in der zwei verschiedene Dosierungen des VEGF-Inhibitors

## Zusammenfassung

Ranibizumab untersucht wurden, konzipiert und betreut. Da im Rahmen dieser Studie unter anderem die Beeinflussung der systemischen VEGF-Spiegel überprüft wurde, wurde außerdem ein Projekt zur Etablierung einer validen VEGF-Messmethodik durchgeführt. Die Ergebnisse des klinischen Teils zeigen, dass auch in Deutschland während der letzten Jahre die Behandlung der Frühgeborenenretinopathie mittels VEGF-Inhibition zugenommen hat, wobei in allen im Register erfassten Fällen die halbe Erwachsenenendosis eingesetzt wurde. Eine wichtige Beobachtung aus den Registerdaten war, dass eine Behandlung der Frühgeborenenretinopathie mit VEGF-Inhibitoren zu deutlich späteren Rezidiven führen kann als dies bei der Laserkoagulation der Fall ist. Auch in der CARE-ROP Studie zeigte sich, dass bei Kindern, die ein Rezidiv der behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie zeigten, dieses im Mittel ca. 10 Wochen nach der initialen Behandlung auftrat (die laserbehandelten Kinder, die im Register ein Rezidiv zeigten, benötigten nach 3,8 Wochen eine erneute Behandlung). Aus der CARE-ROP Studie wurden in dieser Arbeit nur die Sicherheitsdaten der ersten 13 Patienten ausgewertet, wobei kein Aspekt aufgefallen war, der zu einem Abbruch eines Studienarms oder der ganzen Studie geführt hätte. Nach diesen Daten konnte man davon ausgehen, dass beide in der Studie verwendeten Dosierungen wirksam sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben somit gezeigt, dass VEGF-Inhibitoren *in vitro* einen signifikanten Einfluss auf das neuro-vaskuläre Interface der Netzhaut haben, das miRNA Profil von HRMVECs durch die Anwesenheit von VEGF-Inhibitoren jedoch nicht beeinflusst wird. Diese Aspekte bedürfen sicherlich weiterer Untersuchungen, beruhigen jedoch auch teilweise, besonders vor dem Aspekt, dass in Deutschland immer mehr VEGF-Inhibitoren zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie eingesetzt werden. Klinisch sprachen bei der Zwischenauswertung der CARE-ROP Studie keine Sicherheitsaspekte gegen die beiden in der Studie untersuchten Dosierungen des VEGF-Inhibitors Ranibizumab zur Behandlung der Frühgeborenenretinopathie. Allerdings müssen die Endauswertung sowie die Langzeit Ergebnisse der CARE-ROP Studie abgewartet werden, um Wirksamkeit und Sicherheit der Studiendaten abschließend bewerten zu können.

## 7 Veröffentlichungen

### Manuskripte

Pre-Analytical Parameters Affecting Vascular Endothelial Growth Factor Measurement in Plasma: Identifying Confounders	Walz JM, Boehringer D, Deissler HL, Faerber L, Goepfert JC, Heiduschka P, Kleeberger SM, Klettner A, Krohne TU, Schneiderhan-Marra N, Ziemssen F, Stahl A	PLoS ONE (282) doi:10.1371/journal.pone.0145375
The German ROP Registry: data from 90 infants treated for retinopathy of prematurity	Walz JM, Bemme S, Pielen A, Aisenbrey S, Breuß H, Alex AF, Wagenfeld L, Schiedel S, Krohne TU and Stahl A on behalf of the Retina.net ROP Registry	Acta Ophthalmologica (47) doi: 10.1111/aos.13069
CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy	Bucher F, Walz JM, Bühler A, Aguilar E, Lange C, Diaz-Aguilar S, Martin G, Schlunck G, Agostini H, Friedlander M and Stahl A	IOVS (219) doi: 10.1167/iovs.15-18508
SEMA3F protects against subretinal neovascularization in vivo	Sun Y, Liegl R, Gong Y, Bühler A, Cakir B, Meng S, Burnim S, Liu C-H, Reuer T, Zhang P, Walz JM, Ludwig F, Lange C, Agostini H, Böhringer D, Schlunck G, Smith L, Stahl A	EBioMedicine (330) doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.026
Comparing alternative ranibizumab dosages for safety and efficacy in ROP (CARE-ROP): a randomized clinical trial	Stahl A, Krohne TU, Eter N, Oberacher-Velten I, Guthoff R, Meltendorf S, Ehrt O, Aisenbrey S, Roeder J, Gerding H, Jandek C, Smith LEH, Walz JM for the CARE-ROP Study Group	Angenommen bei JAMA Paediatrics (76)
Impact of angiogenic activation and inhibition on miRNA profiles of human retinal endothelial cells	Walz JM, Wecker T, Zhang PP, Cakir B, Gruening B, Agostini H, Reuer T, Ludwig F, Boneva S, Faerber L, Lange C, Schlunck GR, Stahl A	In Vorbereitung, wird voraussichtlich eingereicht bei Experimental Eye Research
Behandelte Frühgeborenenretinopathie in Deutschland: 5-Jahresdaten des Retina.net ROP Registers	Walz JM, Krohne TU, Stahl A für das Retina.net ROP Register	In Vorbereitung

### Vortrag

Behandlungsbedürftige Frühgeborenenretinopathie - erste Daten des Retina.net ROP Registers	Walz JM für die ROP Register Studiengruppe	DOG 2015, Berlin, Deutschland
--	--	-------------------------------

## Veröffentlichungen

### Poster

CARE-ROP-IIT, Interventionelle Studie zu Ranibizumab bei Frühgeborenenretinopathie	Walz JM, Stahl A	Makula Update 2013, Hamburg, Deutschland Posterpreis
Pre-analytical parameters have significant impacts on VEGF levels measured from human plasma	Walz JM, Boehringer D, Deissler HL, Heiduschka P, Klettner A, Krohne TU, Ziemssen F, Stahl A	ARVO 2015, Denver, USA
Pre-analytical parameters affecting VEGF measurements from human plasma	Walz JM, Boehringer D, Deissler HL, Faerber L, Goepfert J, Heiduschka P, Kleeberger SM, Klettner A, Krohne TU, Schneiderhan-Marra N, Ziemssen F, Stahl A	6h International Symposium on AMD, 2015, Baden-Baden, Deutschland
Epidemiologie und Therapie der behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie – die Hannoveraner Daten im Retina.net ROP Register	Akman SH, Walz JM, Pfeiffer A, Stahl A, Kracht T, Bohnhorst B, Framme C, Pielen A	DOG 2015, Berlin, Deutschland
The German ROP Registry: Association of demographic factors and the requirement for re-treatments of retinopathy of prematurity	Walz JM, Bemme S, Boehringer D, Pielen A, Aisenbrey S, Breuß H, Alex AF, Wagenfeld L, Schiedel S, Krohne TU, Stahl A for the Retina.net ROP Registry	ARVO 2016, Seattle, USA
Überprüfung des Zusammenhangs demographischer Faktoren mit dem Bedarf für Re-Injektionen	Walz JM, Bemme S, Boehringer D, Pielen A, Aisenbrey S, Breuß H, Alex AF, Wagenfeld L, Schiedel S, Krohne TU, Stahl A für das Retina.net ROP Register	DOG 2016, Berlin, Deutschland "Poster of the Day"
miRNA profile of human retinal endothelial cells in starvation or angiogenic stimulation with and without VEGF inhibitors	Walz JM, Wecker T, Zhang P, Cakir B, Grüning B, Agostini H, Faerber L, Lange C, Schlunck G, Stahl A	ARVO 2017, Baltimore, USA
Expression pattern of Semaphorin 3F in outer retina and RPE	Cakir B, Walz JM, Lange C, Bühler A, Schlunck G, Agostini H, Klettner A, Stahl A	ARVO 2017, Baltimore, USA
Corneal expression pattern of Semaphorin 3F	Reuer T, Cakir B, Bock F, Bühler A, Walz JM, Lange C, Agostini H, Schlunck G, Cursiefen C, Reinhard T, Stahl A	ARVO 2017, Baltimore, USA
Epidemiologie und Therapie der behandlungsbedürftigen Frühgeborenenretinopathie – die Hannoveraner Daten im Retina.net ROP Register von 2002-2017	Akmann SH, Walz JM, Pfeiffer A, Stahl A, Ehlers S, Bohnhorst B, Framme C, Brockmann D, Hufendiek K, Pielen A	DOG 2017, Berlin, Deutschland



## 8 Danksagung

“Determine that the thing can and shall be done, and then we shall find the way.”

– *Abraham Lincoln, US-Präsident (1809 – 1865)*

Die einleitenden Worte des 16. US-Präsidenten beschreiben den Prozess dieser Doktorarbeit und treffen Wegmarken sowie Meilensteine – und sei es nur aus meiner Sicht – auf den Punkt. Sie sind im Grunde Sinnbild der letzten 5 Jahre meiner Promotion, die mit Abgabe und Veröffentlichung dieser Arbeit abgeschlossen wird.

Da ich in diesem herausfordernden Projekt und an den verschiedensten Weggabelungen von vielen Menschen begleitet wurde, möchte ich mich im Folgenden bei all den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Lothar Färber möchte ich mich für die Überlassung und Betreuung dieser sehr interessanten Promotionsprojekte ganz herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Stahl, der mich in den vergangenen Jahren in meinem Tun unterstützt sowie betreut hat und zu dem ich mit allen Fragen und Problemen jederzeit kommen konnte. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Auch Herrn Prof. Dr. Günther Schlunck, der während meiner Laborzeit in Freiburg immer ein offenes Ohr für meine vielen Fragen (besonders zum miRNA Teil) hatte und sie geduldig beantwortete, möchte ich herzlich danken.

Prof. Dr. Hans-Jürgen Agostini, PD Dr. Clemens Lange und Dr. Gottfried Martin möchte ich für die vielen Donnerstag Abende danken, an denen wir diskutiert haben – erst durch euch wurde diese Arbeit zu dem, was sie jetzt ist.

Das unglaubliche Team im Labor in Freiburg darf hier natürlich nicht vergessen werden: unsere TAs Johannes, Marc und René waren immer für mich da, standen mit Rat und Tat zur Seite und sorgten auch für das leibliche Wohl. Anima, Antonia, Bertan, Franziska, Julia, Thabo, Thomas, Tristan, Yannik, und besonders Paola und Pei Pei dürfen nicht unerwähnt bleiben. Es waren diese Menschen, die mich während meiner Laborzeit begleitet und diese unvergesslich gemacht haben. Danke vor allem auch für die vielen Stunden, die ich abseits des Labors gemeinsam mit euch verbringen durfte.

Meine Zeit in Freiburg wurde aber nicht nur durch meine Arbeitskollegen, sondern auch durch die Mitbewohner meiner WG Angelina, Christoph, Jean-Pierre, Jonas, Maria und Sophie im Wohnheim versüßt. Danke für jedes Gespräch, jede Joggingrunde und jeden lustigen Abend, den wir gemeinsam verbracht haben! Ich hoffe, wir werden noch lange befreundet sein!

## Danksagung

Dr. Stefan Scheidl, der mich am Anfang meiner Dissertation in sein Team aufnahm und den Kontakt nach Freiburg herstellte, möchte ich natürlich ebenfalls danken. Des Weiteren dürfen die Kollegen aus der TA Ophthalmologie, allen voran Jessica, die mich während meiner Zeit in Nürnberg immer mit Ratschlägen, Tipps und Tricks sowie guten Worten unterstützten, nicht vergessen werden.

Den CROs CROLL und Winicker, sowie den Studienteams an den verschiedenen Zentren möchte ich meinen Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der CARE-ROP Studie zukommen lassen. Ebenfalls danken möchte ich Dr. Deissler, PD Dr. Heiduschka, Prof. Dr. Klettner, Prof. Dr. Krohne, Prof. Dr. Ziemssen und ihren Arbeitsgruppen für die Kooperation im Rahmen des VEGF Messmethodikprojekts.

Nicht vergessen werden dürfen meine Freunde, die in den letzten Jahren und besonders den letzten Monaten nur sehr wenig von mir gehört haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich unterstützt habt und mich immer wieder auf andere Gedanken gebracht habt. Einen besonderen Dank verdienen Janina, Sarah und Michael, die mir während der letzten Jahre als Freunde, die ähnliches durchmachten, zur Seite standen.

Veronika war in den letzten Jahren meine direkte Weggefährtin und konnte die durchlebten Höhen und Tiefen oft am besten nachvollziehen. Vielen Dank, dass du mich auf diesem Weg begleitet und ihn erträglich gemacht hast!

Mein Dank geht besonders an Matthias, der seit mittlerweile mehr als acht Jahren an meiner Seite steht und es hoffentlich noch lange tun wird. Du hast fast das ganze Studium und nun auch die Dissertation zusammen mit mir durchgestanden. Danke für jedes Lächeln, das du auf mein Gesicht zauberst, für jedes Wort, das du im richtigen Moment sagst, und für jede Umarmung zum richtigen Zeitpunkt. Du bist das Beste, was mir je passiert ist und ich bin sehr glücklich, dass du die letzten Jahre an meiner Seite warst, wenn auch manchmal in weiter Ferne.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meinen Geschwistern Steffi und Michael. Danke, dass ihr jederzeit für mich da seid! Steffi, du warst schon immer mein großes Vorbild, ich bin unglaublich froh, dass ich dich habe!

Mein allergrößter Dank geht an meine Mama und meinen Papa, die mir allen Rückhalt gegeben haben, den man sich wünschen kann, auch wenn sie in den letzten Jahren oft auf mich verzichten mussten. Ohne eure Unterstützung und euren Zuspruch wäre ich sicherlich nicht dort, wo ich heute bin.

DANKE!!!!

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die bei der Durchführung von Versuchen beteiligten Personen sind an entsprechender Stelle in dieser Arbeit vermerkt.

Das VEGF-Messmethodik Projekt wurde als Ringversuch durchgeführt. Weitere an diesem Projekt beteiligte Parteien waren die Universitätsaugenklinik Tübingen, Münster, Bonn, Ulm und Kiel, sowie das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut in Reutlingen.

Ein Teil der statistischen Auswertung zu diesem Projekt (lineare Regression) wurde unterstützt von Prof. Dr. Daniel Böhringer, Universitätsaugenklinik Freiburg.

Ein Teil der Auswertung der Daten des Retina.net ROP Registers (logistische Regression) wurde ebenfalls unterstützt von Prof. Dr. Daniel Böhringer, Universitätsaugenklinik Freiburg.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

## 10 Zusätzliche Anmerkungen

Diese Arbeit entstand in der Zeit von September 2012 bis Dezember 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lothar Färber an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Laborarbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Stahl im Angiogenese-Labor der Universitätsaugenklinik in Freiburg im Breisgau. Des Weiteren wird das Retina.net ROP Register von der Universitätsaugenklinik Freiburg geleitet, die außerdem Sponsor der CARE-ROP Studie war.

Das Projekt zur Bestimmung der Einflussparameter auf die VEGF-Messung wurde als Ringversuch durchgeführt. Weitere an diesem Projekt beteiligte Parteien waren die Universitätsaugenklinik Tübingen, Münster, Bonn, Ulm und Kiel, sowie das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut in Reutlingen.

Die Durchführung dieser Projekte erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Andreas Stahl, (Universitätsaugenklinik Freiburg).

Lothar Färber ist Professor am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Regensburg sowie als Medizinischer Direktor bei der Novartis Pharma GmbH Deutschland angestellt.

Diese Dissertation wurde finanziell durch die Novartis Pharma GmbH Deutschland unterstützt.

Teile der Arbeit wurden in „Plos One“ und „Acta Ophthalmologica“ veröffentlicht. Die Erlaubnis dieser beiden Journals zur Verwendung der Daten wurde eingeholt und von den Journals bewilligt.

## 11 Glossar der verwendeten Abkürzungen

Ago2	Argonaut 2; Protein, das zusammen mit Dicer und TRBP den RISC Komplex bildet	GA	gauge
AMD	Altersbedingte Makula-degeneration	GFAP	glial fibrillary acidic protein
AP-ROP	Aggressive posteriore ROP	GNN	German neonatal network
Bcl-2	B-cell lymphoma 2	HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1- $\alpha$
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor	HRE	HIF response element
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	HRMVEC	Human Retinal Microvascular Endothelial Cell
BSA	Bovines Serum Albumin	HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
BVA	Berufsverband der Augenärzte Deutschlands	ICROP	The international classification of Retinopathy of Prematurity
CCD	Charge Coupled Device (dt. ladungsgekoppeltes Bauteil)	IGF-1	Insulin like growth factor-1
Cdc42	Rho-GTPase	IGFBP-3	IGF binding protein-3
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid	IgG	Immunglobulin G
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor	IQR	Interquartilsrange
CTAD	Citrat, Theophyllin, Adenin, Dipyridamol (Antikoagulans)	LAF	Laminar Air Flow
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gen 8	LBW	low birthweight infants
DMÖ	Diabetisches Makulaödem	LED	light emitting diode
DMSO	Dimethylsulfoxid	MAPK	mitogen-activated protein kinase
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft	MDD	Minimal detectable dose
ds	doppelsträngig	mRNA	messenger RNA
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution	miRNA	microRNA, auch miR oder miRNA; nichtcodierende RNA mit einer Größe von 18-25 Nukleotiden
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium	nAMD	neovaskuläre AMD
ECBM	Endothelial Cell Basal Medium	NGS	Next Generation Sequencing /
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Antikoagulans)	NMI	Normal Goat Serum
EGF	Endothelial Growth Factor	NO	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut
ELBW	extremely low birthweight infants	NT	Stickstoffmonoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	OIR	Nukleotide
eNOS	endotheliale NO Synthase	p38 MAPK	Oxygen-induced retinopathy (Mausmodell)
ERK	extracellular signal-regulated kinase	PBS	mitogen activated protein kinase p38
FAK	focal adhesion kinase	PDGFR- $\beta$	Phosphate Buffered Saline, nahezu physiologische Salzlösung
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor	PDT	platelet derived growth factor Rezeptor- $\beta$
FCS	fetal calf serum	PECT	Photodynamische Therapie
FGF-2	fibroblast growth factor-2	PF-4	Prostaglandin, EDTA, Carbonat, Theophyllin (Edinburgh Antikoagulans)
			Platelet Factor 4

## Glossar der verwendeten Abkürzungen

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	RPE	Retinales Pigmentepithel
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat	rpm	rounds per minute
PKB	Proteinkinasase B	RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription
PKC	Proteinkinase C	siRNA	small interfering RNA
PLC-γ	Phospholipase C-γ	Src	Sarcoma; eine Tyrosinkinase
PLGF	placental growth factor	TGF-β	Transforming growth factor-β
PMA	postmenstruelles Alter	TRBP	The human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein; zusammen mit Dicer und Ago2 Teil des RISC Komplexes
Pre-miRNA	Precursor miRNA		
Pri-miRNA	Primary miRNA		
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction		
Rac/Raf/Ras	Rho-GTPasen	VEGF	Vascular endothelial growth factor (dt. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
RG	Retinologische Gesellschaft		
RISC	RNA induced silencing complex		
RNA	ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)	VLBW	very low birthweight infants
ROP	Retinopathy of Prematurity (dt. Frühgeborenenretinopathie)	VPF	vascular permeability factor

## 12 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Übersicht über die embryonale Entwicklung des Auges .....	18
<b>Abbildung 2:</b>	Schematischer Aufbau der Retina .....	19
<b>Abbildung 3:</b>	Übersicht zur Krankheitsentstehung der Frühgeborenenretinopathie.....	23
<b>Abbildung 4:</b>	Einteilung des Auges in Zonen und Uhrzeiten bei der Frühgeborenenretinopathie .....	24
<b>Abbildung 5:</b>	Darstellungen der verschiedenen Stadien der Frühgeborenenretinopathie .....	25
<b>Abbildung 6:</b>	Aktivierung von Endothelzellen und die Bildung der ersten Sprossung aus einem bestehenden Gefäß .....	36
<b>Abbildung 7:</b>	Die wichtigsten Kaskaden im VEGF-A/VEGFR-2 Signalweg .....	37
<b>Abbildung 8:</b>	Biogenese der miRNA .....	44
<b>Abbildung 9:</b>	Kultivierung der Endothelzellsphäroide im hängenden Tropfen .....	60
<b>Abbildung 10:</b>	Aufbau des HUVEC Sphäroidassays .....	61
<b>Abbildung 11:</b>	Versuchsaufbau zur Bestimmung des miRNA Profils von HRMVECs unter Hungerbedingung, sowie angiogener Stimulation und Hemmung dieser .....	64
<b>Abbildung 12:</b>	Angewendeter Workflow zur Auswertung der NGS-Daten.....	66
<b>Abbildung 13:</b>	OIR-Inkubationsschrank und seine Funktionalitäten .....	70
<b>Abbildung 14:</b>	Mikroskopische Kontrolle der Transfektion bei Methodenetablierung der Lipotransfektion von HRMVECs .....	73
<b>Abbildung 15:</b>	Versuchsaufbau des angepassten Sphäroidassays zum Vergleich untransfizierter HRMVECs mit HRMVECs, die mit hsa-miR-335-5p, bzw. cel-miR-39-3p transfiziert wurden.....	75
<b>Abbildung 16:</b>	Graphische Darstellung des in vitro Modells für das neuro-vaskuläre Interface .....	76
<b>Abbildung 17:</b>	Einfluss neuronaler Zellen auf das Sprossverhalten von Endothelzellsphäroiden .....	78
<b>Abbildung 18:</b>	Kumulative Länge sphäroidaler Aussprossungen in Abhängigkeit von der Dichte, der darunter kultivierten neuronalen Zellen .....	79
<b>Abbildung 19:</b>	Auswirkung der VEGF-Inhibition auf die durch neuronale Zellen induzierte Sprossung ..	80

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 20:</b>	Die 15 häufigsten miRNAs, die mind. 1 % des miRNoms ausmachten.....	82
<b>Abbildung 21:</b>	Vergleich der miRNA Expression unter angiogener Stimulation (12 h) und anschließender VEGF-Inhibition (12 h) im Vergleich zur reinen angiogenen Stimulation für 24 h .....	83
<b>Abbildung 22:</b>	Übersicht über die zwischen den Gruppen unterschiedlich exprimierten miRNAs .....	85
<b>Abbildung 23:</b>	Änderung der Expression der 10 miRNAs, die in mindestens einer Gruppe im Vergleich zur Gruppe der Hungerbedingung statistisch signifikant und relevant vermehrt oder weniger stark exprimiert wurden .....	87
<b>Abbildung 24:</b>	Änderung der Expression der fünf miRNAs, die mind. 1 % des miRNoms ausmachten und in einer der Gruppen im Vergleich zur Hungerbedingung signifikant um mind. 15 % vermehrt oder weniger stark exprimiert wurden .....	88
<b>Abbildung 25:</b>	Vergleich der NGS-Daten mit den qPCR-Ergebnissen zweier unabhängig voneinander durchgeführter Validierungsversuche für die Gruppen angiogene Stimulation (AS) (a), AS + Avastin® (b), AS + Eylea® (c) und AS + Lucentis® (d) jeweils versus Hungerbedingung .....	91
<b>Abbildung 26:</b>	Vergleich der Expression der in vitro zwischen der angiogenen Stimulation und der Hungerbedingung veränderten miRNAs (bestätigt mittels qPCR), zwischen a) OIR- und NOIR- Mäusen und b) Injektion von Eylea® vs. DPBS in OIR-Mäusen .....	92
<b>Abbildung 27:</b>	Vergleich der Expression der miRNAs, die in vitro besonders stark exprimiert waren, im OIR-Modell zwischen a) OIR- und NOIR-Mäusen und b) Injektion von Eylea® vs. Injektion von DPBS in OIR-Mäusen .....	93
<b>Abbildung 28:</b>	Die Online-Applikation miRWalk lieferte 159 Zielgene für miR-139-5p und miR-139-3p, sowie 2760 Zielgene für miR-335-5p und miR-335-3p .....	94
<b>Abbildung 29:</b>	Die Online-Applikation miRWalk lieferte 145 Zielgene für die miR-126-5p und miR-126-3p sowie 938 Zielgene für die miR-21-5p, miR-29a-3p und miR-100-5p .....	96
<b>Abbildung 30:</b>	Exemplarische HRMVEC-Sphäroide bestehend aus a) untransfizierten Zellen, b) aus mit der microRNA-Mimic für hsa-miR-335-5p transfizierten Zellen und c) aus mit der microRNA-Mimic für die Kontrolle (cel-miR-39-3p) transfizierten Zellen .....	99
<b>Abbildung 31:</b>	Quantitative Auswertung des Einflusses der Transfektion auf die Sprosslänge von HRMVEC-Sphäroiden .....	100



<b>Abbildung 32:</b>	Schematische Darstellung der Verblindung in der CARE-ROP Studie .....	124
<b>Abbildung 33:</b>	Übersicht über den Ringversuch zur VEGF-A-Messmethodik .....	131
<b>Abbildung 34:</b>	Zusammenhang des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie mit der absoluten Gewichtszunahme bis zum Zeitpunkt der Behandlungsentscheidung.....	137
<b>Abbildung 35:</b>	Zusammenstellung des Schweregrads der Frühgeborenenretinopathie .....	141
<b>Abbildung 36:</b>	Der schwerste vorliegende Grad der Frühgeborenenretinopathie in Abhängigkeit vom Alter bei Geburt .....	142
<b>Abbildung 37:</b>	Übersicht über die Verteilung der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie zwischen 2011 und 2014 .....	145
<b>Abbildung 38:</b>	Histogramme des Geburtsgewichts aufgeteilt nach der Häufigkeit der Behandlung .....	148
<b>Abbildung 39:</b>	Histogramm der Dauer der Sauerstoffsupplementation aufgeteilt nach der Häufigkeit der Behandlung.....	149
<b>Abbildung 40:</b>	Art der angewendeten Anästhetika bei Laserkoagulation und bei Einsatz von VEGF-Inhibitoren .....	149
<b>Abbildung 41:</b>	Vorkommen von ophthalmologischen (a) und systemischen (b) Komplikationen während bzw. innerhalb von 24 h nach der Behandlung .....	150
<b>Abbildung 42:</b>	Verteilung der Rescue- und Re-Injektionen auf die beiden Behandlungsarme .....	154
<b>Abbildung 43:</b>	Scatterplot des Einflusses der Kanüle auf gemessene VEGF-Spiegel .....	158
<b>Abbildung 44:</b>	Einfluss der verwendeten Antikoagulantien (EDTA, PECT und CTAD) auf die Plasmaspiegel von VEGF-A, PF-4 und IGF-1 .....	159
<b>Abbildung 45:</b>	Prozentrage an VEGF-A, welches in EDTA-, PECT- oder CTAD-PBS wiedergefunden wurde .....	160
<b>Abbildung 46:</b>	Einfluss des Füllstands der Entnahmeröhrchen auf die gemessenen VEGF-Spiegel.....	161
<b>Abbildung 47:</b>	Einfluss der Zeit vor der Zentrifugation auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel .....	162
<b>Abbildung 48:</b>	Einfluss der Lagerzeit nach der Zentrifugation auf EDTA- (a, b) und PECT- (c, d) Proben.....	163
<b>Abbildung 49:</b>	Einfluss der Zentrifugenart (Feststellrotor vs. Ausschwenkrotor) auf die VEGF-A-, PF-4- und IGF-1-Messwerte .....	164

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 50:</b> Einfluss des Geschlechts auf die gemessenen VEGF-A-Spiegel in der zusätzlichen nachgeschalteten Analyse .....	164
<b>Abbildung 51:</b> Scatterplot des Vergleichs der VEGF-A-Spiegel an Baseline und eine Woche später .....	165
<b>Abbildung 52:</b> Gepaarte Plots (rosa) und Boxplots (blau) der VEGF-A-Spiegel, die an den Blutentnahmezentren, den korrespondierenden Messzentren und dem Zentrallabor (ZL) gemessen wurden.....	166
<b>Abbildung 53:</b> Vergleich der ELISA- und Luminex-Messwerte.....	167
<b>Abbildung 54:</b> Standardkurve der Standard-Proteine (VEGF-A) aus dem ELISA- und dem Luminex-Kit vermessen in beiden Kits .....	167
<b>Abbildung 55:</b> Übersicht über gemessene VEGF-A-Extremwerte.....	169
<b>Abbildung 56:</b> c(t) Werte für die verschiedenen überprüften Sequenzen zur Normalisierung der qPCR Daten im OIR-Modell .....	204
<b>Abbildung 57:</b> c(t) Werte für die Housekeeping-miRNA miR-let-7e-5p der einzelnen Behandlungsgruppen der beiden Wiederholungsversuche .....	209
<b>Abbildung 58:</b> Visitenübersicht CARE-ROP Kernstudie .....	211
<b>Abbildung 59:</b> Angepasstes Visitenschema nach einer Re-Injektion .....	212
<b>Abbildung 60:</b> Geplanter Visitenablauf für den Follow-Up Zeitraum der CARE-ROP Studie .....	213
<b>Abbildung 61:</b> Schema der Probenbehandlung nach Blutentnahme in der CARE-ROP Studie .....	215

### 13 Tabellenverzeichnis

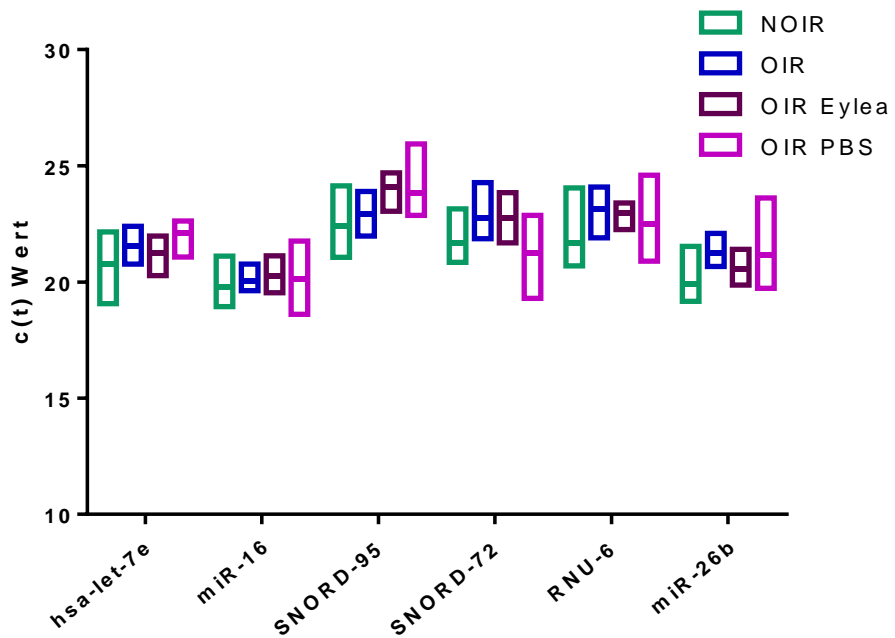
<b>Tabelle 1:</b>	Übersicht über die wichtigsten gesundheitlichen Komplikationen im Zusammenhang mit der Frühgeburt.....	21
<b>Tabelle 2:</b>	Übersicht über die Einteilung der Frühgeborenenretinopathie und die jeweils vorgeschlagene Therapieoption .....	29
<b>Tabelle 3:</b>	Halbwertszeiten von VEGF-Inhibitoren nach intravitrealer Applikation .....	39
<b>Tabelle 4:</b>	Liste der im präklinischen Teil verwendeten Substanzen .....	50
<b>Tabelle 5:</b>	Liste der im präklinischen Teil verwendeten Verbrauchsmittel .....	51
<b>Tabelle 6:</b>	Liste der im präklinischen Teil verwendeten Geräte und Programme .....	52
<b>Tabelle 7:</b>	Liste der verwendeten Zellarten und in der Zellkultur verwendeten Substanzen .....	54
<b>Tabelle 8:</b>	Liste der verwendeten Primer .....	54
<b>Tabelle 9:</b>	Liste der im präklinischen Teil angesetzten Puffer, Lösungen und Medien inklusive Zusätze .....	55
<b>Tabelle 10:</b>	Mastermix Zusammensetzung für die reverse Transkription.....	67
<b>Tabelle 11:</b>	Mastermix Zusammensetzung für die qPCR.....	68
<b>Tabelle 12:</b>	qPCR Cycling Bedingungen .....	69
<b>Tabelle 13:</b>	Übersicht über die signifikant und relevant veränderten miRNAs.....	86
<b>Tabelle 14:</b>	Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-335-5p und miR-335-3p.....	95
<b>Tabelle 15:</b>	Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-21-5p, miR-29a-3p und miR-100-5p .....	97
<b>Tabelle 16:</b>	Die zehn häufigsten GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der Targets von miR-126-5p und miR-126-3p.....	97
<b>Tabelle 17:</b>	Die GO Oberbegriffe der GO Enrichment Analyse der gemeinsamen Targets von miR-21-5p, miR-29a-3p, miR-100-5p, miR-126-5p und miR-126-3p.....	98
<b>Tabelle 18:</b>	Liste der im klinischen Teil verwendeten Chemikalien .....	129

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 19:</b>	Liste der im klinischen Teil verwendeten Verbrauchsmittel .....	129
<b>Tabelle 20:</b>	Liste der im klinischen Teil verwendeten Geräte und Kits .....	129
<b>Tabelle 21:</b>	Liste der im klinischen Teil verwendeten Programme .....	130
<b>Tabelle 22:</b>	Verwendetes Antikoagulans.....	130
<b>Tabelle 23:</b>	Vorliegende Sauerstoffsupplementation und Ko-Erkrankungen aufgetrennt nach Schweregrad der Frühgeborenenretinopathie.....	139
<b>Tabelle 24:</b>	Postmenstruelles (PMA) und postnatales (PNA) Alter bei Behandlung nach Gestationsalter bei Geburt .....	143
<b>Tabelle 25:</b>	Übersicht über die 17 Kinder (31 Augen), die mehrfach behandelt wurden .....	147
<b>Tabelle 26:</b>	Übersicht über die Verteilung, Art und Schweregrad der Komplikationen, die im Zusammenhang mit der Behandlung standen und während bzw. innerhalb von 24 Stunden nach dem Eingriff auftraten .....	151
<b>Tabelle 27:</b>	Baseline Charakteristika der ersten 13 Kinder, die in die CARE-ROP Studie eingeschlossen wurden.....	153
<b>Tabelle 28:</b>	Gemeldete schwerwiegende unerwünschte Ereignisse bis zur Beurteilung durch das DSMB am 09.03.2016 aufgeteilt nach den beiden Behandlungsarmen (A und B).....	155
<b>Tabelle 29:</b>	Ergebnisse der Regressionsanalyse des Vorprojekts zur VEGF-Messung .....	157
<b>Tabelle 30:</b>	Vorkommen der 67 statistisch signifikant veränderten miRNAs in den jeweiligen Bedingungen .....	205
<b>Tabelle 31:</b>	Übersicht über die miRNAs, welche mind. 100mal exprimiert wurden, bei denen die Expressionsänderung zwischen $\leq 0,1$ und $\geq 0,1$ lag und in allen vier Vergleichsgruppen vorkamen .....	208
<b>Tabelle 32:</b>	Ereignisse, die aufgrund der erwarteten Häufigkeit in der CARE-ROP nicht innerhalb von 24 h als SUE gemeldet werden mussten .....	214

## 14 Anhang

### 14.1 Normalisierung der qPCR Daten im OIR-Modell



**Abbildung 56:**  $c(t)$  Werte für die verschiedenen überprüften Sequenzen zur Normalisierung der qPCR Daten im OIR-Modell. Die mittleren  $c(t)$  Werte der Gruppen unterschieden sich für die miR-16 nur um 0,47 Zyklen, während sie für die SNORD-95 um bis zu 1,7 Zyklen schwankten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die weiteren Versuche die miR-16 zur Normalisierung der qPCR im OIR-Modell verwendet.

## 14.2 Vorkommen der 67 statistisch signifikant veränderten miRNAs in den jeweiligen Bedingungen

**Tabelle 30:** Vorkommen der 67 statistisch signifikant veränderten miRNAs in den jeweiligen Bedingungen 42 miRNAs kamen in allen Gruppen vor, während weitere 53 miRNAs jeweils in mindestens einem der Vergleiche auftraten. X: in diesem Vergleich signifikant unterschiedlich exprimiert.

	Angiogene Stimulation vs. Hungerbed.	AS + Lucentis® vs. Hungerbed.	AS + Eylea® vs. Hungerbed.	AS + Avastin® vs. Hungerbed.
hsa-miR-21-5p	x	x	x	x
hsa-miR-23a-3p	x	x	x	x
hsa-miR-29a-3p	x	x	x	x
hsa-miR-30a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-30a-3p	x	x	x	x
hsa-miR-31-5p	x	x	x	x
hsa-miR-99a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-100-5p	x	x	x	x
hsa-miR-29b-3p	x	x	x	x
hsa-miR-192-5p	x	x	x	x
hsa-miR-139-5p	x	x	x	x
hsa-miR-181c-5p	x	x	x	x
hsa-miR-181a-3p	x	x	x	x
hsa-miR-214-3p	x	x	x	x
hsa-miR-216a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-224-5p	x	x	x	x
hsa-miR-27b-3p	x	x	x	x
hsa-miR-137	x	x	x	x
hsa-miR-125a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-126-5p	x	x	x	x
hsa-miR-126-3p	x	x	x	x
hsa-miR-194-5p	x	x	x	x
hsa-miR-195-5p	x	x	x	x
hsa-miR-335-5p	x	x	x	x
hsa-miR-376b-3p	x	x	x	x
hsa-miR-497-5p	x	x	x	x
hsa-miR-503-5p	x	x	x	x
hsa-miR-584-5p	x	x	x	x
hsa-miR-542-3p	x	x	x	x
hsa-miR-21-3p	x	x	x	x
hsa-miR-24-2-5p	x	x	x	x
hsa-miR-29a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-31-3p	x	x	x	x
hsa-miR-100-3p	x	x	x	x
hsa-miR-29b-1-5p	x	x	x	x

hsa-miR-139-3p	x	x	x	x
hsa-miR-335-3p	x	x	x	x
hsa-miR-424-3p	x	x	x	x
hsa-miR-874-3p	x	x	x	x
hsa-let-7a-2-3p	x	x	x	x
hsa-miR-2682-3p	x	x	x	x
hsa-miR-181b-3p	x	x	x	x
hsa-miR-27a-3p	x			x
hsa-let-7c-5p	x		x	
hsa-miR-197-3p	x			x
hsa-miR-218-5p		x	x	
hsa-miR-122-5p	x	x		
hsa-miR-125b-5p		x	x	
hsa-miR-143-3p	x	x		x
hsa-miR-134-5p		x	x	x
hsa-miR-146a-5p	x	x	x	x
hsa-miR-149-5p				x
hsa-miR-154-3p	x			
hsa-miR-185-5p		x	x	
hsa-miR-370-3p	x	x		
hsa-miR-376a-3p			x	
hsa-miR-379-5p		x	x	x
hsa-miR-328-3p		x		x
hsa-miR-323a-3p			x	
hsa-miR-326	x	x		
hsa-miR-151a-3p			x	
hsa-miR-345-5p	x	x		x
hsa-miR-196b-5p		x	x	x
hsa-miR-451a		x		
hsa-miR-409-5p	x	x		x
hsa-miR-409-3p				x
hsa-miR-483-3p				x
hsa-miR-495-3p	x			x
hsa-miR-181d-5p			x	
hsa-miR-455-5p	x			x
hsa-miR-758-3p			x	
hsa-miR-766-3p			x	x
hsa-let-7b-3p			x	
hsa-miR-28-3p			x	
hsa-miR-29b-2-5p	x		x	x
hsa-miR-34a-3p	x			

## Anhang

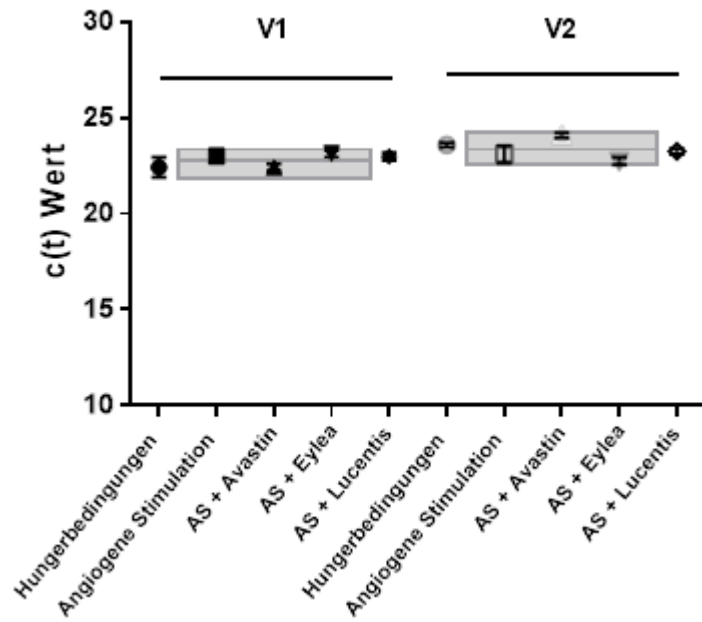
hsa-miR-125b-1-3p	x	x		
hsa-miR-125b-2-3p	x			
hsa-miR-195-3p		x	x	x
hsa-miR-455-3p	x			
hsa-miR-33b-3p			x	
hsa-miR-887-3p	x	x		x
hsa-miR-543	x	x		x
hsa-miR-1291		x	x	x
hsa-miR-1248		x	x	x
hsa-miR-1307-3p	x		x	
hsa-miR-224-3p	x			
hsa-miR-3200-3p	x		x	x
hsa-miR-3613-5p			x	
hsa-miR-4521		x	x	x
hsa-miR-4524a-5p			x	x
hsa-let-7c-3p	x			
hsa-miR-370-5p			x	
hsa-miR-26a-1-3p		x		
hsa-miR-7974	x			



### 14.3 Hsa-let-7e-5p als die am wenigsten regulierte miRNA zwischen den verschiedenen Vergleichen

**Tabelle 31:** Übersicht über die miRNAs, welche mind. 100mal exprimiert wurden, bei denen die Expressionsänderung zwischen  $\leq 0,1$  und  $\geq -0,1$  lag und in allen vier Vergleichsgruppen vorkamen. Für die hsa-let-7e-5p lag die Expressionsänderung in allen vier Gruppen bei den NGS-Daten zwischen  $\leq 0,02$  und  $\geq -0,02$ , weshalb diese miRNA als Housekeeping Gen für die qPCR verwendet wurde; hellblaue Schattierung markiert die Werte, die zwischen  $\leq 0,02$  und  $\geq -0,02$  lagen; Mittlere Reads: der Durchschnitt der Reads aus den verglichenen Gruppen; AS: Angiogene Stimulation

	AS vs. Hungerbedingung		AS + Avastin* vs. Hungerbedingung		AS + Eylea* vs. Hungerbedingung		AS + Lucentis* vs. Hungerbedingung	
	Mittlere Reads	Expressions- änderung	Mittlere Reads	Expressions- änderung	Mittlere Reads	Expressions- änderung	Mittlere Reads	Expressions- änderung
hsa-miR-93-5p	14321,39	0,09	13869,51	-0,00	15293,99	0,10	15884,69	0,02
hsa-miR-106b-5p	13809,57	0,06	13786,32	0,05	14928,28	0,09	15495,32	0,02
hsa-miR-222-5p	1110,90	-0,01	1138,02	0,05	1230,41	0,09	1277,69	0,02
hsa-let-7i-5p	18779,88	0,06	18733,95	0,05	20013,79	0,06	21082,27	0,02
hsa-miR-17-3p	969,86	-0,06	970,15	-0,07	1023,42	-0,10	1123,40	-0,01
hsa-let-7d-3p	1081,37	0,00	1102,30	0,05	1124,29	-0,07	1228,92	-0,00
hsa-miR-98-5p	1487,94	0,02	1506,43	0,05	1604,48	0,05	1691,38	0,02
hsa-miR-34a-5p	15599,59	0,07	15520,71	0,05	16426,05	0,04	17525,88	0,04
hsa-miR-539-5p	126,43	-0,01	128,14	0,02	130,35	-0,09	149,66	0,10
hsa-miR-340-5p	1745,15	0,04	1745,81	0,04	1874,09	0,06	2013,59	0,08
hsa-miR-92b-3p	1233,78	0,01	1189,54	-0,10	1335,25	0,05	1358,27	-0,09
hsa-miR-411-5p	1107,41	-0,02	1158,57	0,10	1177,87	-0,03	1278,35	0,02
hsa-miR-154-5p	211,67	-0,04	221,56	0,08	224,20	-0,06	251,08	0,07
hsa-miR-362-5p	740,68	0,07	727,17	0,01	761,46	-0,04	797,40	-0,09
hsa-miR-26b-5p	7037,38	-0,08	7210,87	-0,02	7684,83	-0,02	8167,52	-0,03
hsa-let-7g-5p	7887,05	-0,05	8075,96	0,01	8629,19	0,02	9242,06	0,03
hsa-miR-17-5p	18450,43	0,06	18212,48	0,01	19436,46	0,02	20488,77	-0,01
hsa-miR-374a-5p	10074,23	-0,07	10071,56	-0,08	10919,44	-0,03	11725,33	-0,01
hsa-miR-505-3p	931,14	0,10	922,33	0,06	967,59	0,02	1045,16	0,06
hsa-miR-92a-3p	904,54	-0,01	882,02	-0,08	959,27	-0,03	1013,29	-0,05
hsa-miR-18a-5p	10126,94	0,04	9903,99	-0,02	10545,15	-0,02	11138,45	-0,05
hsa-miR-299-5p	393,15	-0,06	405,70	0,02	425,47	-0,02	445,86	-0,07
hsa-miR-193b-3p	1633,17	0,08	1630,86	0,07	1702,88	0,01	1813,48	0,01
hsa-miR-369-5p	414,93	0,06	419,20	0,09	434,50	0,01	462,04	0,01
hsa-miR-217	4757,57	-0,05	4719,36	-0,08	5155,70	-0,01	5398,74	-0,06
hsa-let-7e-5p	7157,12	-0,02	7269,08	0,02	7710,44	0,01	8182,60	-0,01
hsa-miR-20a-5p	33944,73	0,03	33379,08	-0,02	35711,98	-0,01	37577,93	-0,05
hsa-let-7d-5p	3158,19	0,06	3141,05	0,04	3294,58	-0,00	3474,60	-0,04
hsa-miR-148b-3p	3722,85	-0,08	3731,88	-0,08	4080,84	-0,00	4344,01	-0,01



**Abbildung 57:** c(t) Werte für die Housekeeping-miRNA miR-let-7e-5p der einzelnen Behandlungsgruppen der beiden Wiederholungsversuche. Der graue Kasten zeigt den Mittelwert (mittlerer Strich), sowie den Minimal- und Maximalwert an. Die schwarzen Symbole zeigen den mittleren c(t) Wert ( $\pm$ SD) für die jeweiligen Behandlungsgruppen.

## 14.4 Visitenschemata der CARE-ROP Studie

Visit number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16
Period	SCN	BSL and treatment	Observation period														End of study <sup>h</sup>
Study day	Day -3 to -1	Day 0 (+1) <sup>e</sup>	Day 1 <sup>e</sup>	Day 3 (+/-1) <sup>e</sup>	Day 7 +/-1 day	Day 14 +/-2 days	Day 21 +/-2 days	Day 28 +/-2 days	Day 35 +/-2 days	Day 42 +/-2 days	Day 56 +/-3 days	Day 70 +/-3 days	Day 84 +/- 3 days	Day 112 +/-5 days	Day 140 +/- 5 days		Day 168 +/- 5 days
					week 1	week 2	week 3	week 4	week 5	week 6	week 8	week 10	week 12	week 16	week 20		week 24
Procedure																	
Informed consent	X																
Randomization		X															
Injection of study drug		X															
Medical History and Prior Medication (incl. supplemental oxygen requirement)	X	X															
Concomitant medication (incl. supplemental oxygen requirement)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Demographics	X																
Inclusion/Exclusion criteria	X	X															
Anterior segment exam <sup>a</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Fundoscopy/Staging of ROP <sup>b</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Retinal Photographs <sup>c</sup>		X			X			X									X
Physical examination <sup>d</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							X
Vital signs <sup>d</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							X
(Serious) Adverse Events <sup>e</sup>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
Blood draws for VEGF levels <sup>f</sup>		X			X	(X)	X	(X)	X	(X)							

<sup>a</sup> ophthalmic examinations by indirect ophthalmoscopy including assessment for postoperative intraocular infection where appropriate.

<sup>b</sup> including baseline measurement for efficacy assessment and efficacy assessment after an injection has taken place and including assessment for postoperative intraocular infection on day 1 and 3 after injection.

<sup>c</sup> RetCam documentation shall be done if a RetCam is available. Also other comparable imaging systems able to document ROP stage and zone can be used. The baseline images can be taken at day 0 or day -1 at the discretion of the treating ophthalmologist. An additional retinal photograph to the ones listed in table 7-1 shall be taken in all cases of recurrence and need for rescue treatment or re-injection.

<sup>d</sup> For visits 11-15 patients only need to come to the eye clinics.

<sup>e</sup> All Serious Adverse Events have to be reported immediately after the signing of the Informed Consent. All Adverse Events have to be reported immediately after the first injection.

<sup>f</sup> Assessments marked with an X are obligatory if health condition of the infant allows blood withdrawal, assessments marked with an (X) can be done additionally at the discretion of the treating physician. The blood draws should be done in combination with other regular blood draws to avoid an additional puncture.

<sup>g</sup> The bilateral injection of ranibizumab can be split to be performed on two consecutive days (at the discretion of the treating ophthalmologist and according to local routine).

<sup>h</sup> At 24 weeks post first injection, the last regular study visit takes place. If a late re-injection is applied, the patient is in all cases at least followed-up with weekly study visits for 4 weeks after injection.

The table above outlines all required study visits. Additional visits can be necessary and performed at the discretion of the treating physician at any time. In this case, the acquired data on ROP disease activity from the additional visits shall be documented within the study CRFs.

If at  $\geq 28$  days after the first injection a re-injection is necessary, post-injection assessments shall take place exactly like after the first injection (day 1, day 3, then week 1, etc.). In this case, the new assessment schedule replaces the one triggered by the first injection. End of the study, however, remains 24 weeks after the first injection.

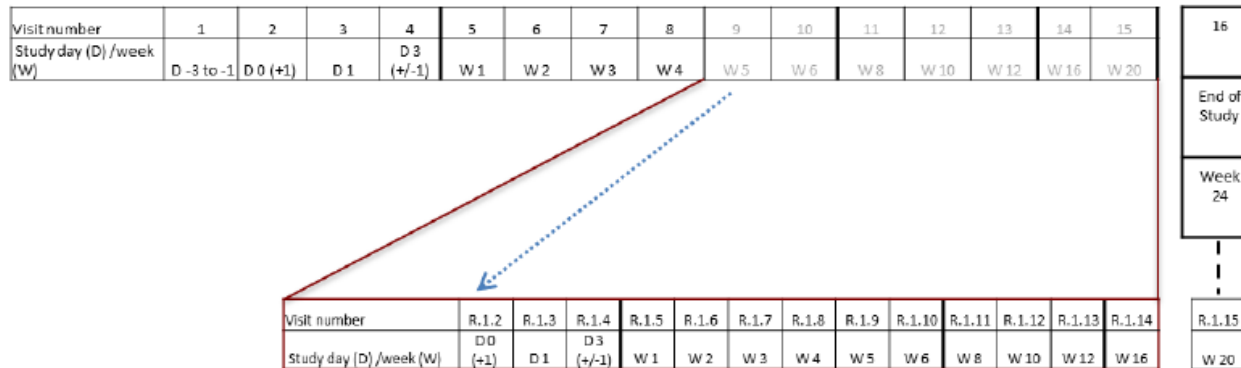
At 1 year (+/- 2 months), 2 years (+/- 3 months) and 5 years (+/- 6 months) after the first intravitreal injection, exploratory follow-up visits are planned.

**Abbildung 58:** Visitenübersicht CARE-ROP Kernstudie

### Visit schedule after re-injection:

Whenever  $\geq 28$  days after the first injection, a re-injection is performed, all post-injection assessments shall take place exactly as after the first injection. In case of a re-injection, the new assessment schedule therefore replaces the one triggered by the first injection. All re-injections are followed-up with at least 4 weekly study visits. The primary study endpoint, however, remains at 24 weeks after the first injection for all infants.

#### Example 1: Re-injection 5 weeks after initial injection



#### Example 2: Reinjection at 22 weeks after initial injection

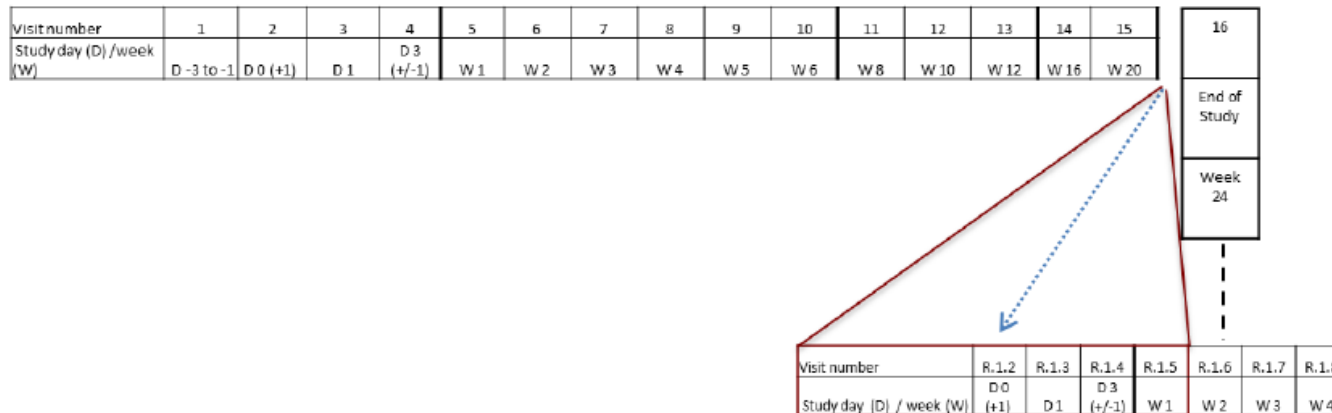
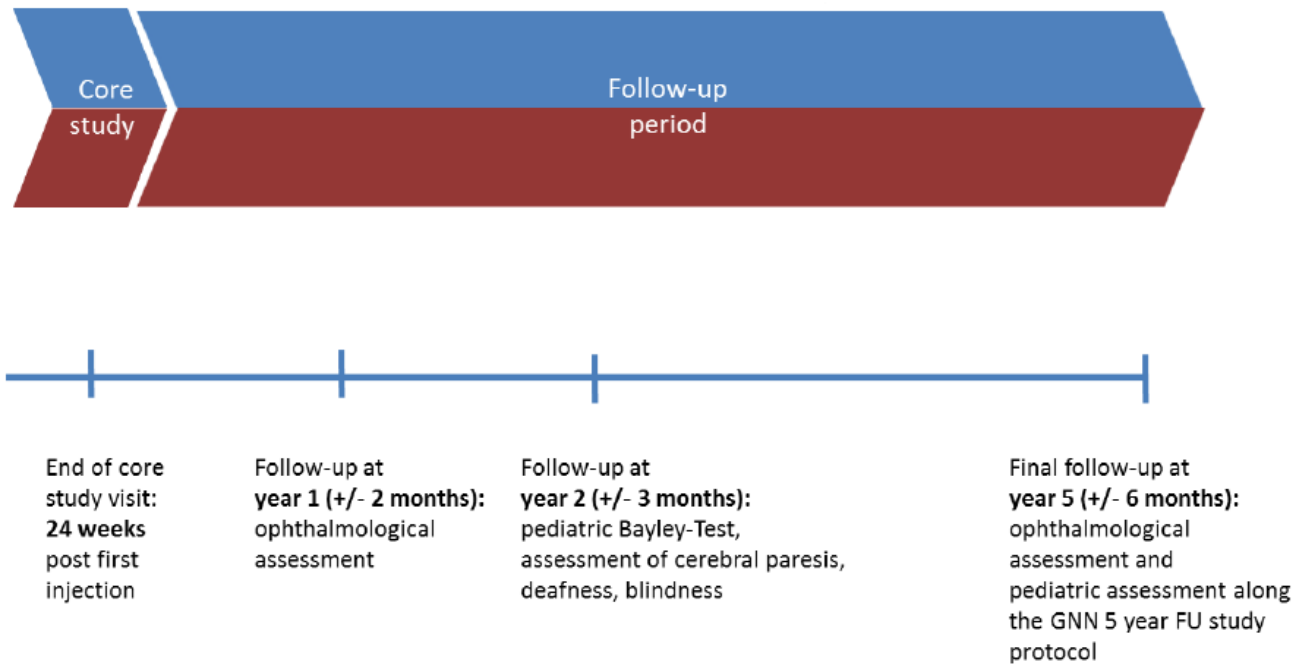


Abbildung 59: Angepasstes Visitenchema nach einer Re-Injektion



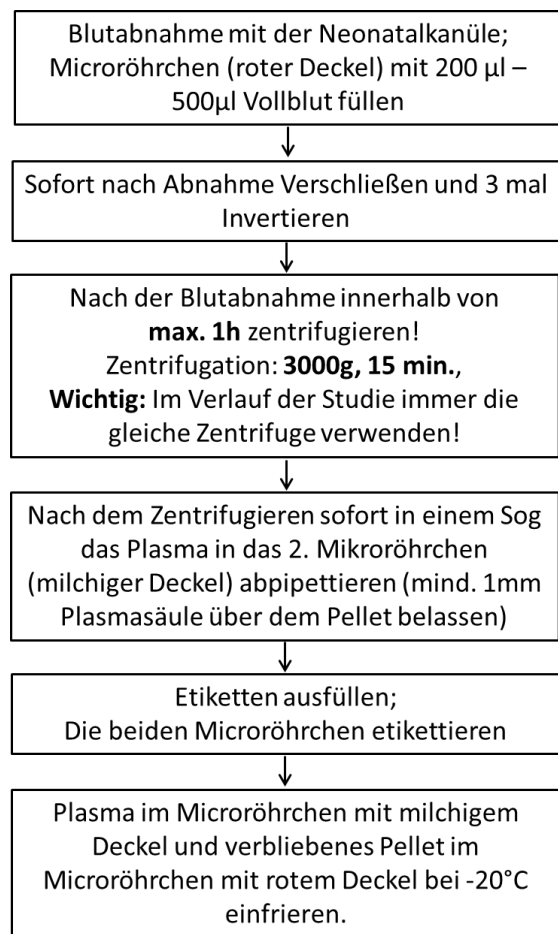
**Abbildung 60:** Geplanter Visitenablauf für den Follow-Up Zeitraum der CARE-ROP Studie

## 14.5 Liste der Ereignisse, die in der CARE-ROP nicht als SUE innerhalb von 24 h gemeldet werden mussten

**Tabelle 32:** Ereignisse, die aufgrund der erwarteten Häufigkeit in der CARE-ROP nicht innerhalb von 24 h als SUE gemeldet werden mussten

Erwartet mit einer Häufigkeit von >10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Krankenhausaufenthalt im Zuge einer Re-Injektion des Studienmedikaments</li> <li>• Nosokomiale Infektionen (einschließlich Blutkultur-positiver Sepsis, klinische Sepsis und Pneumonie gemäß der NEOKISS Definition)</li> <li>• Chronische Lungenerkrankung bei Frühgeborenen</li> <li>• Ventrikulomegalie</li> </ul>
Erwartet mit einer Häufigkeit von 5-10 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nekrotisierende Enterocolitis &gt; 2°</li> </ul>
Erwartet mit einer Häufigkeit von <5 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neu diagnostizierter (nicht vorbestehend), behandlungsbedürftiger, offener Ductus arteriosus</li> <li>• Periventrikuläre Leukomalazie</li> <li>• Porenzephalische Zyste</li> <li>• durch Blut übertragene Infektion</li> <li>• Transfusionsreaktion</li> <li>• Pneumothorax</li> <li>• Pulmonales interstitielles Emphysem</li> <li>• Pulmonale Hypertension</li> <li>• Darmverschlingung</li> <li>• Posthämorrhagischer Hydrocephalus / ventrikuläre Dilatation, die durch eine Shunt-Operation behandelt werden muss</li> <li>• Ventrikulo-peritoneale Shunt-Infektion</li> <li>• Systemische Infektion mit dem Cytomegalievirus (CMV)</li> </ul>

## 14.6 Schema Probenbehandlung nach Blutentnahme in der CARE-ROP Studie



**Abbildung 61:** Schema der Probenbehandlung nach Blutentnahme in der CARE-ROP Studie



## 15 Literaturverzeichnis

1. Terry TL. Extreme Prematurity and Fibroblastic Overgrowth of Persistent Vascular Sheath Behind Each Crystalline Lens. *American journal of ophthalmology*. 1942;25(2):203-4.
2. Sadler TW. *Medizinische Embryologie*. Stuttgart Thieme; 2003.
3. Crivellato E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4-5):365-75.
4. Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, Krasnow MA. The branching programme of mouse lung development. *Nature*. 2008;453(7196):745-50.
5. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):61-8.
6. Choi ME, Ballermann BJ. Inhibition of capillary morphogenesis and associated apoptosis by dominant negative mutant transforming growth factor-beta receptors. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(36):21144-50.
7. Dunker N, Kriegelstein K. Targeted mutations of transforming growth factor-beta genes reveal important roles in mouse development and adult homeostasis. *Eur J Biochem*. 2000;267(24):6982-8.
8. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 2002;129(20):4797-806.
9. Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, et al. Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(49):35172-8.
10. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-5.
11. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-105.
12. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.
13. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266(18):11947-54.
14. Saint-Geniez M, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8-9):1045-58.
15. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(41):25646-54.

16. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(47):31283-8.
17. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376(6535):66-70.
18. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011;437(2):169-83.
19. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(3):227-41.
20. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92(6):735-45.
21. Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):245-51.
22. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw*. 2009;20(4):158-63.
23. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod*. 1994;51(3):524-30.
24. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;110 Suppl 1:S10-8.
25. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool*. 1989;251(2):224-31.
26. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380(6573):435-9.
27. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*. 1999;126(6):1149-59.
28. Kühl M, Gessert S. *Entwicklungsbiologie*: UTB GmbH; 2010.
29. Ulfing N. *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart: Thieme; 2009.
30. Gerhard K. Lang JE, Oskar Gareis, Gabriele E. Lang, Stefan J. Lang, Christoph W. Spraul, Peter Wagner. *Augenheilkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2008.
31. Vögeler J. *Pharmakotherapie und Humanpharmakologische Untersuchungen bei Patienten mit DME (Diabetisches Makulaödem) und PDR (Proliferative Diabetische Retinopathie) anhand klinischer Parameter und inflammatorischer Biomarker* 2016.
32. Shui YB, Wang X, Hu JS, Wang SP, Garcia CM, Potts JD, et al. Vascular endothelial growth factor expression and signaling in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(9):3911-9.
33. Hittner HM, Hirsch NJ, Rudolph AJ. Assessment of gestational age by examination of the anterior vascular capsule of the lens. *J Pediatr*. 1977;91(3):455-8.

34. Dreher Z, Robinson SR, Distler C. Muller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals. *J Comp Neurol.* 1992;323(1):59-80.
35. Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(7):1201-14.
36. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995;15(7 Pt 1):4738-47.
37. Gariano RF. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(3):295-306.
38. Christian P. Speer MG. Pädiatrie. Berlin Heidelberg: Springer; 2013.
39. Axel Hübner GJ. Neonatologie - Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
40. Committee E-PS. THE EUROPEAN PERINATAL HEALTH REPORT 2010. 2010.
41. Jandek C, Kellner U, Lorenz B, Seiberth V, Arbeitsgruppe der Retinologischen Gesellschaft zur Erstellung der Leitlinie zur augenärztlichen Screening-Untersuchung von F. [Guidelines for ophthalmological screening of premature infants in Germany]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2008;225(2):123-30.
42. Ancel PY, Goffinet F, Group E-W, Kuhn P, Langer B, Matis J, et al. Survival and morbidity of preterm children born at 22 through 34 weeks' gestation in France in 2011: results of the EPIPAGE-2 cohort study. *JAMA Pediatr.* 2015;169(3):230-8.
43. Jarjour IT. Neurodevelopmental outcome after extreme prematurity: a review of the literature. *Pediatr Neurol.* 2015;52(2):143-52.
44. March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. Geneva: World Health Organization; 2012.
45. Austeng D, Kallen KB, Ewald UW, Jakobsson PG, Holmstrom GE. Incidence of retinopathy of prematurity in infants born before 27 weeks' gestation in Sweden. *Archives of ophthalmology.* 2009;127(10):1315-9.
46. Holmstrom G, Hellstrom A, Jakobsson P, Lundgren P, Tornqvist K, Wallin A. Five years of treatment for retinopathy of prematurity in Sweden: results from SWEDROP, a national quality register. *Br J Ophthalmol.* 2016.
47. Walz JM, Bemme S, Pielen A, Aisenbrey S, Breuss H, Alex AF, et al. The German ROP Registry: data from 90 infants treated for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol.* 2016.
48. Lorenz B. [Current ophthalmic aspects of acute retinopathy of prematurity]. *Ophthalmologe.* 2008;105(12):1092-100.
49. Stahl A, Aisenbrey S, Krohne TU. [Retinopathy of prematurity - pathophysiologic mechanisms and new treatment options]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2012;229(10):1024-9.
50. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol.* 1954;38(7):397-432.

51. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(1):101-11.
52. Smith LE. Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(12):5177-82.
53. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(3):905-9.
54. Smith LE, Hard AL, Hellstrom A. The biology of retinopathy of prematurity: how knowledge of pathogenesis guides treatment. *Clin Perinatol.* 2013;40(2):201-14.
55. Hellstrom A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet.* 2013;382(9902):1445-57.
56. International Committee for the Classification of Retinopathy of P. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Archives of ophthalmology.* 2005;123(7):991-9.
57. Bolton DPG, Cross KW. FURTHER OBSERVATIONS ON COST OF PREVENTING RETROLENTAL FIBROPLASIA. *The Lancet.* 303(7855):445-8.
58. Kayton A, Timoney P, Vargo L, Perez JA. A Review of Oxygen Physiology and Appropriate Management of Oxygen Levels in Premature Neonates. *Adv Neonatal Care.* 2017.
59. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: preliminary results. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Pediatrics.* 1988;81(5):697-706.
60. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Three-month outcome. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Archives of ophthalmology.* 1990;108(2):195-204.
61. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative G. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Snellen visual acuity and structural outcome at 5 1/2 years after randomization. *Archives of ophthalmology.* 1996;114(4):417-24.
62. Palmer EA, Hardy RJ, Dobson V, Phelps DL, Quinn GE, Summers CG, et al. 15-year outcomes following threshold retinopathy of prematurity: final results from the multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. *Archives of ophthalmology.* 2005;123(3):311-8.
63. McNamara JA, Tasman W, Vander JF, Brown GC. Diode laser photocoagulation for retinopathy of prematurity. Preliminary results. *Archives of ophthalmology.* 1992;110(12):1714-6.
64. Connolly BP, McNamara JA, Sharma S, Regillo CD, Tasman W. A comparison of laser photocoagulation with trans-scleral cryotherapy in the treatment of threshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 1998;105(9):1628-31.
65. Pearce IA, Pennie FC, Gannon LM, Weindling AM, Clark DI. Three year visual outcome for treated stage 3 retinopathy of prematurity: cryotherapy versus laser. *Br J Ophthalmol.* 1998;82(11):1254-9.
66. Ng EY, Connolly BP, McNamara JA, Regillo CD, Vander JF, Tasman W. A comparison of laser photocoagulation with cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity at 10 years: part 1. Visual function and structural outcome. *Ophthalmology.* 2002;109(5):928-34; discussion 35.
67. Connolly BP, Ng EY, McNamara JA, Regillo CD, Vander JF, Tasman W. A comparison of laser photocoagulation with cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity at 10 years: part 2. Refractive outcome. *Ophthalmology.* 2002;109(5):936-41.

68. Hardy RJ, Good WV, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, Quintos M, et al. Multicenter trial of early treatment for retinopathy of prematurity: study design. *Control Clin Trials*. 2004;25(3):311-25.
69. Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative G. Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. *Archives of ophthalmology*. 2003;121(12):1684-94.
70. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative G, Good WV, Hardy RJ, Dobson V, Palmer EA, Phelps DL, et al. Final visual acuity results in the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Archives of ophthalmology*. 2010;128(6):663-71.
71. Good WV, Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative G. The Early Treatment for Retinopathy Of Prematurity Study: structural findings at age 2 years. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(11):1378-82.
72. Ziylan S, Ozturk V, Yabas-Kiziloglu O, Ciftci F. Myopia, visual acuity and strabismus in the long term following treatment of retinopathy of prematurity. *Turk J Pediatr*. 2014;56(5):518-23.
73. Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ, Group B-RC. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*. 2011;364(7):603-15.
74. Hoerster R, Muether P, Dahlke C, Mehler K, Oberthur A, Kirchhof B, et al. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor in an infant treated with ranibizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol*. 2013;91(1):e74-5.
75. Menke MN, Framme C, Nelle M, Berger MR, Sturm V, Wolf S. Intravitreal ranibizumab monotherapy to treat retinopathy of prematurity zone II, stage 3 with plus disease. *BMC Ophthalmol*. 2015;15:20.
76. Stahl AK, T. U.; Eter, N.; Oberacher-Velten, I.; Guthoff, R.; Meltendorf, S.; Ehrt, O.; Aisenbrey, S.; Roeder, J.; Gerding, H.; Jandek, C.; Smith, L. E. H.; Walz, J. M.; for the CARE-ROP Study Group. Comparing alternative ranibizumab dosages for safety and efficacy in ROP (CARE-ROP): a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr*. 2018.
77. Shire Announces Top-Line Results for Phase 2 Trial of SHP607 in Extremely Premature Infants [press release]. Lexington, Mass., 30.06.2016.
78. Holmstrom GE, Hellstrom A, Jakobsson PG, Lundgren P, Tornqvist K, Wallin A. Swedish national register for retinopathy of prematurity (SWEDROP) and the evaluation of screening in Sweden. *Archives of ophthalmology*. 2012;130(11):1418-24.
79. Fierston WM, Ophthalmology AAoPSo, Ophthalmology AAo, Strabismus AAfPO, Orthoptists AAoC. Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. *Pediatrics*. 2013;131(1):189-95.
80. Laws DE, Morton C, Weindling M, Clark D. Systemic effects of screening for retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol*. 1996;80(5):425-8.
81. Eriksson L, Liden U, Lofqvist C, Hellstrom A. WINROP can modify ROP screening praxis: a validation of WINROP in populations in Sormland and Vastmanland. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(7):964-6.
82. Hard AL, Lofqvist C, Fortes Filho JB, Procianoy RS, Smith L, Hellstrom A. Predicting proliferative retinopathy in a Brazilian population of preterm infants with the screening algorithm WINROP. *Archives of ophthalmology*. 2010;128(11):1432-6.

## Literaturverzeichnis

83. Lundgren P, Hard AL, Wilde A, Lofqvist C, Smith LEH, Hellstrom A. Implementing higher oxygen saturation targets reduced the impact of poor weight gain as a predictor for retinopathy of prematurity. *Acta paediatrica*. 2017.
84. Stellungnahmen der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbands der Augenärzte Deutschlands zum Einsatz von Bevacizumab in der Therapie der Frühgeborenenretinopathie. *Der Ophthalmologe*. 2012;109(2):193-204.
85. Honda S, Hirabayashi H, Tsukahara Y, Negi A. Acute contraction of the proliferative membrane after an intravitreal injection of bevacizumab for advanced retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246(7):1061-3.
86. Zepeda-Romero LC, Liera-Garcia JA, Gutierrez-Padilla JA, Valtierra-Santiago CI, Avila-Gomez CD. Paradoxical vascular-fibrotic reaction after intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Eye (Lond)*. 2010;24(5):931-3.
87. Padhi TR, Das T, Rath S, Pradhan L, Sutar S, Panda KG, et al. Serial evaluation of retinal vascular changes in infants treated with intravitreal bevacizumab for aggressive posterior retinopathy of prematurity in zone I. *Eye (Lond)*. 2016;30(3):392-9.
88. Lepore D, Quinn GE, Molle F, Baldascino A, Orazi L, Sammartino M, et al. Intravitreal bevacizumab versus laser treatment in type 1 retinopathy of prematurity: report on fluorescein angiographic findings. *Ophthalmology*. 2014;121(11):2212-9.
89. Tahija SG, Hersetyati R, Lam GC, Kusaka S, McMenamin PG. Fluorescein angiographic observations of peripheral retinal vessel growth in infants after intravitreal injection of bevacizumab as sole therapy for zone I and posterior zone II retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(4):507-12.
90. Geloneck MM, Chuang AZ, Clark WL, Hunt MG, Norman AA, Packwood EA, et al. Refractive outcomes following bevacizumab monotherapy compared with conventional laser treatment: a randomized clinical trial. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(11):1327-33.
91. Hwang CK, Hubbard GB, Hutchinson AK, Lambert SR. Outcomes after Intravitreal Bevacizumab versus Laser Photocoagulation for Retinopathy of Prematurity: A 5-Year Retrospective Analysis. *Ophthalmology*. 2015;122(5):1008-15.
92. Ittiera S, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ. Exudative retinopathy and detachment: a late reactivation of retinopathy of prematurity after intravitreal bevacizumab. *J AAPOS*. 2013;17(3):323-5.
93. Moshfeghi DM, Berrocal AM. Retinopathy of prematurity in the time of bevacizumab: incorporating the BEAT-ROP results into clinical practice. *Ophthalmology*. 2011;118(7):1227-8.
94. Sato T, Wada K, Arahori H, Kuno N, Imoto K, Iwahashi-Shima C, et al. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *American journal of ophthalmology*. 2012;153(2):327-33 e1.
95. Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, Dhoot DS, Pieramici DJ, See R, et al. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(12):1636-41.
96. Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Wada M, Takahashi K, Nishimura T. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol*. 2010;94(9):1215-8.

97. Darlow BA, Ells AL, Gilbert CE, Gole GA, Quinn GE. Are we there yet? Bevacizumab therapy for retinopathy of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98(2):F170-4.
98. Zhou Y, Jiang Y, Bai Y, Wen J, Chen L. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of retinopathy of prematurity with ranibizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016;254(1):31-6.
99. Yalin Imamoglu E, Gunay M, Gursoy T, Imamoglu S, Balci Ekmekci O, Celik G, et al. Effect of laser photocoagulation on plasma levels of VEGF-A, VEGFR-2, and Tie2 in infants with retinopathy of prematurity. *J AAPOS.* 2014;18(5):466-70.
100. Lien R, Yu MH, Hsu KH, Liao PJ, Chen YP, Lai CC, et al. Neurodevelopmental Outcomes in Infants with Retinopathy of Prematurity and Bevacizumab Treatment. *PLoS One.* 2016;11(1):e0148019.
101. Morin J, Luu TM, Superstein R, Ospina LH, Lefebvre F, Simard MN, et al. Neurodevelopmental Outcomes Following Bevacizumab Injections for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics.* 2016;137(4).
102. Verordnung (EG) Nr. 1901/2006 des europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 über Kinderarzneimittel und zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1768/92, der Richtlinien 2001/20/EG und 2001/83/EG sowie der Verordnung (EG) Nr. 726/2004.
103. Arzneimittelgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005 (BGBl. I S. 3394), das durch Artikel 2 des Gesetzes vom 20. Dezember 2016 (BGBl. I S. 3048) geändert worden ist.
104. Richtlinie 2001/20/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 4. April 2001 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten über die Anwendung der guten klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Humanarzneimitteln (ABl. L 121 vom 1.5.2001, S. 34).
105. VFA. Kinder und Jugendliche in klinischen Studien. Berlin 2013.
106. Walter-Sack I. HWE. Klinische Studien: Arzneimittelsicherheit auch für Kinder. *Dtsch Arztebl International.* 2001;98(8):A: 447-9.
107. Ghorbani M, Dolatian M, Shams J, Alavi-Majd H, Tavakolian S. Factors associated with posttraumatic stress disorder and its coping styles in parents of preterm and full-term infants. *Glob J Health Sci.* 2014;6(3):65-73.
108. Bruns-Neumann E. [How do parents experience the premature birth of their child?]. *Pflege.* 2006;19(3):146-55.
109. Kersting A, Dorsch M, Wesselmann U, Ludorff K, Witthaut J, Ohrmann P, et al. Maternal posttraumatic stress response after the birth of a very low-birth-weight infant. *J Psychosom Res.* 2004;57(5):473-6.
110. Caldwell PH, Butow PN, Craig JC. Parents' attitudes to children's participation in randomized controlled trials. *J Pediatr.* 2003;142(5):554-9.
111. Morley CJ, Lau R, Davis PG, Morse C. What do parents think about enrolling their premature babies in several research studies? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(3):F225-8.
112. Antonia M. Jousen, Thomas W. Gardner, Bernd Kirchhof, Ryan SJ. Retinal Vascular Disease. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.

## Literaturverzeichnis

113. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(6):2813-26.
114. Carolyn A. Staton, Claire Lewis, Bicknell R. *Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques.* Chichester, England: J. Wiley & Sons; 2006.
115. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1341-52.
116. Korff T, Augustin HG. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci.* 1999;112 ( Pt 19):3249-58.
117. Heiss M, Hellstrom M, Kalen M, May T, Weber H, Hecker M, et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J.* 2015;29(7):3076-84.
118. Pfisterer L, Korff T. Spheroid-Based In Vitro Angiogenesis Model. *Methods Mol Biol.* 2016;1430:167-77.
119. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1565-73.
120. Heinke J, Patterson C, Moser M. Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012;4:2269-88.
121. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146(6):873-87.
122. Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development.* 2011;138(21):4569-83.
123. Velez-Montoya R, Clapp C, Rivera JC, Garcia-Aguirre G, Morales-Canton V, Fromow-Guerra J, et al. Intraocular and systemic levels of vascular endothelial growth factor in advanced cases of retinopathy of prematurity. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:947-53.
124. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 1994;331(22):1480-7.
125. Sonmez K, Drenser KA, Capone A, Jr., Trese MT. Vitreous levels of stromal cell-derived factor 1 and vascular endothelial growth factor in patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology.* 2008;115(6):1065-70 e1.
126. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology.* 1996;103(11):1820-8.
127. Krzystolik MG, Afshari MA, Adamis AP, Gaudreault J, Gragoudas ES, Michaud NA, et al. Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. *Archives of ophthalmology.* 2002;120(3):338-46.
128. Rubio RG, Adamis AP. Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Dev Ophthalmol.* 2016;55:28-37.
129. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5.



130. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):993-8.
131. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 1999;126(13):3015-25.
132. Smith BT, Joseph DP, Grand MG. Treatment of neovascular age-related macular degeneration: past, present and future directions. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007;18(3):240-4.
133. Romero-Aroca P, Reyes-Torres J, Baget-Bernaldiz M, Blasco-Sune C. Laser treatment for diabetic macular edema in the 21st century. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(2):100-12.
134. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET, Jr., Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(2):123-32.
135. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR, Group VISiONCT. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2805-16.
136. Eyetech Study G. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology.* 2003;110(5):979-86.
137. Lowe J, Araujo J, Yang J, Reich M, Oldendorp A, Shiu V, et al. Ranibizumab inhibits multiple forms of biologically active vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2007;85(4):425-30.
138. Novartis. Fachinformation Lucentis 10 mg/ml Injektionslösung. 2016.
139. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11393-8.
140. Bayer. Fachinformation Eylea 40 mg/ml Injektionslösung in einer Durchstechflasche. 2017.
141. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400.
142. Krohne TU, Holz FG, Meyer CH. [Pharmacokinetics of intravitreally administered VEGF inhibitors]. *Ophthalmologe.* 2014;111(2):113-20.
143. van Bilsen K, van Hagen PM, Bastiaans J, van Meurs JC, Missotten T, Kuijpers RW, et al. The neonatal Fc receptor is expressed by human retinal pigment epithelial cells and is downregulated by tumour necrosis factor-alpha. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(6):864-8.
144. Sternberg P, Jr., Landers MB, 3rd, Wolbarsht M. The negative coincidence of retinitis pigmentosa and proliferative diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology.* 1984;97(6):788-9.
145. Lahdenranta J, Pasqualini R, Schlingemann RO, Hagedorn M, Stallcup WB, Bucana CD, et al. An anti-angiogenic state in mice and humans with retinal photoreceptor cell degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(18):10368-73.
146. Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D, Zaniolo K, Joyal JS, Cho JH, et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med.* 2008;14(10):1067-76.
147. Bautch VL, James JM. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr.* 2009;3(2):199-204.
148. Bill A, Sperber GO. Control of retinal and choroidal blood flow. *Eye (Lond).* 1990;4 ( Pt 2):319-25.

149. Kondo M, Wang L, Bill A. The role of nitric oxide in hyperaemic response to flicker in the retina and optic nerve in cats. *Acta Ophthalmol Scand.* 1997;75(3):232-5.
150. Forster BA, Ferrari-Dileo G, Anderson DR. Adrenergic alpha 1 and alpha 2 binding sites are present in bovine retinal blood vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(11):1741-6.
151. Ferrari-Dileo G. Beta 1 and beta 2 adrenergic binding sites in bovine retina and retinal blood vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(5):695-9.
152. Qian H, Ripps H. Neurovascular interaction and the pathophysiology of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:693426.
153. Fletcher EL, Phipps JA, Ward MM, Vessey KA, Wilkinson-Berka JL. The renin-angiotensin system in retinal health and disease: Its influence on neurons, glia and the vasculature. *Prog Retin Eye Res.* 2010;29(4):284-311.
154. Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Neurovascular interactions in the retina: physiological and pathological roles. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(2):79-84.
155. Seigel GM. The golden age of retinal cell culture. *Molecular vision.* 1999;5:4.
156. Vecino E, Heller JP, Veiga-Crespo P, Martin KR, Fawcett JW. Influence of extracellular matrix components on the expression of integrins and regeneration of adult retinal ganglion cells. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125250.
157. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):256-65.
158. Hansen NU, Genovese F, Leeming DJ, Karsdal MA. The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Exp Mol Pathol.* 2015;98(2):286-94.
159. Picaud S, Hicks D, Forster V, Sahel J, Dreyfus H. Adult human retinal neurons in culture: Physiology of horizontal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(13):2637-48.
160. Akagawa K, Barnstable CJ. Identification and characterization of cell types in monolayer cultures of rat retina using monoclonal antibodies. *Brain Res.* 1986;383(1-2):110-20.
161. Politi LE, Lehar M, Adler R. Development of neonatal mouse retinal neurons and photoreceptors in low density cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988;29(4):534-43.
162. Barres BA, Silverstein BE, Corey DP, Chun LL. Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron.* 1988;1(9):791-803.
163. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
164. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
165. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10A):1902-10.
166. Ul Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res.* 2012;349(2):405-13.
167. Tagawa H, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci.* 2007;98(9):1482-90.

168. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol.* 2004;14(23):2162-7.
169. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-9.
170. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-6.
171. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 2001;293(5531):834-8.
172. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 2005;123(4):631-40.
173. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
174. Agrawal S, Chaqour B. MicroRNA signature and function in retinal neovascularization. *World J Biol Chem.* 2014;5(1):1-11.
175. Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(3):311-30.
176. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15-20.
177. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature.* 2005;435(7043):745-6.
178. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(3):219-30.
179. Wang S, Olson EN. AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(3):205-11.
180. Baehrecke EH. miRNAs: micro managers of programmed cell death. *Curr Biol.* 2003;13(12):R473-5.
181. Luna C, Li G, Huang J, Qiu J, Wu J, Yuan F, et al. Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c. *PLoS One.* 2012;7(12):e51688.
182. Voellenkle C, Rooij J, Guffanti A, Brini E, Fasanaro P, Isaia E, et al. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA.* 2012;18(3):472-84.
183. McCall MN, Kent OA, Yu J, Fox-Talbot K, Zaiman AL, Halushka MK. MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Med Genomics.* 2011;4:78.
184. Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 2007;100(8):1164-73.
185. Wang W, Zhang E, Lin C. MicroRNAs in tumor angiogenesis. *Life Sci.* 2015;136:28-35.
186. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* 2008;15(2):261-71.
187. Wang L, Lee AY, Wigg JP, Peshavariya H, Liu P, Zhang H. miR-126 Regulation of Angiogenesis in Age-Related Macular Degeneration in CNV Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).

188. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(23):15878-83.
189. Huettnner JE, Baughman RW. Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci*. 1986;6(10):3044-60.
190. Shi J, Marinovich A, Barres BA. Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *J Neurosci*. 1998;18(12):4627-36.
191. Yu L, Wu X, Cheng Z, Lee CV, LeCouter J, Campa C, et al. Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(2):522-7.
192. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012;15(2):171-85.
193. Hutton-Smith LA, Gaffney EA, Byrne HM, Maini PK, Schwab D, Mazer NA. A Mechanistic Model of the Intravitreal Pharmacokinetics of Large Molecules and the Pharmacodynamic Suppression of Ocular Vascular Endothelial Growth Factor Levels by Ranibizumab in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Mol Pharm*. 2016;13(9):2941-50.
194. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, et al. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(47):18363-70.
195. MacDonald DA, Martin J, Muthusamy KK, Luo JK, Pyles E, Rafique A, et al. Aflibercept exhibits VEGF binding stoichiometry distinct from bevacizumab and does not support formation of immune-like complexes. *Angiogenesis*. 2016;19(3):389-406.
196. Muller S, Raulefs S, Bruns P, Afonso-Grunz F, Plotner A, Thermann R, et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2015;14:94.
197. Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Cech M, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W3-W10.
198. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.
199. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357-9.
200. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-9.
201. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
202. Tea M, Michael MZ, Brereton HM, Williams KA. Stability of small non-coding RNA reference gene expression in the rat retina during exposure to cyclic hyperoxia. *Molecular vision*. 2013;19:501-8.
203. Lim QE, Zhou L, Ho YK, Wan G, Too HP. snoU6 and 5S RNAs are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *Neuroscience*. 2011;199:32-43.

204. Loscher CJ, Hokamp K, Kenna PF, Ivens AC, Humphries P, Palfi A, et al. Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome Biol.* 2007;8(11):R248.
205. Liu CH, Wang Z, Sun Y, SanGiovanni JP, Chen J. Retinal expression of small non-coding RNAs in a murine model of proliferative retinopathy. *Sci Rep.* 2016;6:33947.
206. Wecker T, Hoffmeier K, Plotner A, Gruning BA, Horres R, Backofen R, et al. MicroRNA Profiling in Aqueous Humor of Individual Human Eyes by Next-Generation Sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(4):1706-13.
207. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 2008;14(5):844-52.
208. Stahl A, Wu X, Wenger A, Klagsbrun M, Kurschat P. Endothelial progenitor cell sprouting in spheroid cultures is resistant to inhibition by osteoblasts: a model for bone replacement grafts. *FEBS Lett.* 2005;579(24):5338-42.
209. Chang WG, Andrejcsk JW, Kluger MS, Saltzman WM, Pober JS. Pericytes modulate endothelial sprouting. *Cardiovasc Res.* 2013;100(3):492-500.
210. Aghababazadeh M, Kerachian MA. Cell fasting: Cellular response and application of serum starvation. *Journal of Fasting and Health.* 2014;2(4):147-50.
211. Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol.* 2007;171(1):53-67.
212. Lund-Andersen H, Sebag J, Sander B, La Cour M. The Vitreous. In: Fischbarg J, editor. *Advances in Organ Biology.* 10: Elsevier; 2005. p. 181-94.
213. Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004;322(2):684-92.
214. Lee C, Zhang F, Tang Z, Liu Y, Li X. PDGF-C: a new performer in the neurovascular interplay. *Trends Mol Med.* 2013;19(8):474-86.
215. Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, Ishibashi M, McMahon J, McMahon AP. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science.* 2008;322(5905):1247-50.
216. Dorrell MI, Friedlander M. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006;25(3):277-95.
217. Park HY, Kim JH, Park CK. Neuronal cell death in the inner retina and the influence of vascular endothelial growth factor inhibition in a diabetic rat model. *Am J Pathol.* 2014;184(6):1752-62.
218. Mouse Genome Sequencing C, Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520-62.
219. Bucher F, Walz JM, Buhler A, Aguilar E, Lange C, Diaz-Aguilar S, et al. CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(10):4017-26.

220. Weber H, Claffey J, Hogan M, Pampillon C, Tacke M. Analyses of Titanocenes in the spheroid-based cellular angiogenesis assay. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(2):531-4.
221. Florczuk M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Target Oncol*. 2017.
222. Lai X, Wang M, McElyea SD, Sherman S, House M, Korc M. A microRNA signature in circulating exosomes is superior to exosomal glypican-1 levels for diagnosing pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2017.
223. Kolling M, Kaucsar T, Schauerte C, Hubner A, Dettling A, Park JK, et al. Therapeutic miR-21 Silencing Ameliorates Diabetic Kidney Disease in Mice. *Mol Ther*. 2017;25(1):165-80.
224. Hinkel R, Ng JK, Kupatt C. Targeting microRNAs for cardiovascular therapeutics in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol*. 2014;29(6):586-94.
225. Metin T, Dinc E, Gorur A, Erdogan S, Ertekin S, Sari AA, et al. Evaluation of the plasma microRNA levels in stage 3 premature retinopathy with plus disease: preliminary study. *Eye (Lond)*. 2017.
226. Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*. 2008;111(3):1217-26.
227. Ertekin S, Yildirim O, Dinc E, Ayaz L, Fidanci SB, Tamer L. Evaluation of circulating miRNAs in wet age-related macular degeneration. *Molecular vision*. 2014;20:1057-66.
228. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
229. Iraci N, Leonardi T, Gessler F, Vega B, Pluchino S. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):171.
230. Menard C, Rezende FA, Miloudi K, Wilson A, Tetreault N, Hardy P, et al. MicroRNA signatures in vitreous humour and plasma of patients with exudative AMD. *Oncotarget*. 2016;7(15):19171-84.
231. Zhang Y, Cai S, Jia Y, Qi C, Sun J, Zhang H, et al. Decoding Noncoding RNAs: Role of MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Ocular Neovascularization. *Theranostics*. 2017;7(12):3155-67.
232. Romano GL, Platania CBM, Drago F, Salomone S, Ragusa M, Barbagallo C, et al. Retinal and Circulating miRNAs in Age-Related Macular Degeneration: An In vivo Animal and Human Study. *Front Pharmacol*. 2017;8:168.
233. Berber P, Grassmann F, Kiel C, Weber BH. An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol Diagn Ther*. 2017;21(1):31-43.
234. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*. 2010;115(23):4944-50.
235. Usui-Ouchi A, Ouchi Y, Kiyokawa M, Sakuma T, Ito R, Ebihara N. Upregulation of Mir-21 Levels in the Vitreous Humor Is Associated with Development of Proliferative Vitreoretinal Disease. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158043.
236. Jiang Q, Lyu XM, Yuan Y, Wang L. Plasma miR-21 expression: an indicator for the severity of Type 2 diabetes with diabetic retinopathy. *Biosci Rep*. 2017;37(2).
237. Chen XK, Ouyang LJ, Yin ZQ, Xia YY, Chen XR, Shi H, et al. Effects of microRNA-29a on retinopathy of prematurity by targeting AGT in a mouse model. *Am J Transl Res*. 2017;9(2):791-801.

238. Sanchez CA, Andahur EI, Valenzuela R, Castellon EA, Fulla JA, Ramos CG, et al. Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget*. 2016;7(4):3993-4008.
239. Chen Z, Liu X, Hu Z, Wang Y, Liu M, Liu X, et al. Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2015;10(1):329-36.
240. Klettner AK, Kruse ML, Meyer T, Wesch D, Kabelitz D, Roider J. Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247(12):1601-8.
241. Klettner A, Tahmaz N, Dithmer M, Richert E, Roider J. Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(10):1448-52.
242. Deissler HL, Lang GK, Lang GE. Capacity of aflibercept to counteract VEGF-stimulated abnormal behavior of retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2014;122:20-31.
243. Deissler HL, Deissler H, Lang GE. Actions of bevacizumab and ranibizumab on microvascular retinal endothelial cells: similarities and differences. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(7):1023-8.
244. Tschulakow A, Christner S, Julien S, Ludinsky M, van der Giet M, Schraermeyer U. Effects of a single intravitreal injection of aflibercept and ranibizumab on glomeruli of monkeys. *PLoS One*. 2014;9(11):e113701.
245. Virgili G, Parravano M, Evans JR, Gordon I, Lucenteforte E. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6:CD007419.
246. Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, Dhoot DS, Pieramici DJ, See R, et al. Systemic Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravitreal Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab. *Retina*. 2017;37(10):1847-58.
247. Yang J, Wang Q, Qiao C, Lin Z, Li X, Huang Y, et al. Potent anti-angiogenesis and anti-tumor activity of a novel human anti-VEGF antibody, MIL60. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(3):285-93.
248. Yang J, Wang X, Fuh G, Yu L, Wakshull E, Khosraviani M, et al. Comparison of binding characteristics and in vitro activities of three inhibitors of vascular endothelial growth factor A. *Mol Pharm*. 2014;11(10):3421-30.
249. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol*. 2010;188(4):595-609.
250. Travassos A, Teixeira S, Ferreira P, Regadas I, Travassos AS, Esperancinha FE, et al. Intravitreal bevacizumab in aggressive posterior retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2007;38(3):233-7.
251. Goto G, Hori Y, Ishikawa M, Tanaka S, Sakamoto A. Changes in the gene expression levels of microRNAs in the rat hippocampus by sevoflurane and propofol anesthesia. *Mol Med Rep*. 2014;9(5):1715-22.
252. Wang Y, Wu S, Yang Y, Peng F, Li Q, Tian P, et al. Differentially expressed miRNAs in oxygeninduced retinopathy newborn mouse models. *Mol Med Rep*. 2017;15(1):146-52.
253. Lenihan CR, Taylor CT. The impact of hypoxia on cell death pathways. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(2):657-63.

254. Tokunaga CC, Mitton KP, Dailey W, Massoll C, Roumayah K, Guzman E, et al. Effects of anti-VEGF treatment on the recovery of the developing retina following oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(3):1884-92.
255. Feng F, Cheng Y, Liu QH. Bevacizumab treatment reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Int J Ophthalmol*. 2014;7(4):608-13.
256. Zhuang Z, Xiao q, Hu H, Tian SY, Lu ZJ, Zhang TZ, et al. Down-regulation of microRNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway. *Molecular vision*. 2015;21:1173-84.
257. Wang S. A dual function for miR-126 in choroidal neovascularization. *IOVS*. 2015;56(7):43.
258. Meng Y, Zou Q, Liu T, Cai X, Huang Y, Pan J. microRNA-335 inhibits proliferation, cell-cycle progression, colony formation, and invasion via targeting PAX6 in breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2015;11(1):379-85.
259. Lu Y, Yang H, Yuan L, Liu G, Zhang C, Hong M, et al. Overexpression of miR-335 confers cell proliferation and tumour growth to colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2016;412(1-2):235-45.
260. Wang X, Wu G, Cao G, Chen X, Huang J, Jiang X, et al. MicroRNA335 inhibits bladder cancer cell growth and migration by targeting mitogenactivated protein kinase 1. *Mol Med Rep*. 2016;14(2):1765-70.
261. Wang L, Lee AY, Wigg JP, Peshavariya H, Liu P, Zhang H. miRNA involvement in angiogenesis in age-related macular degeneration. *J Physiol Biochem*. 2016;72(4):583-92.
262. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58-63.
263. Salman AG, Said AM. Structural, visual and refractive outcomes of intravitreal aflibercept injection in high-risk prethreshold type 1 retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Res*. 2015;53(1):15-20.
264. Barth T, Hufendiek K, Helbig H, Oberacher-Velten I. [Laser treatment or intravitreal VEGF inhibition for aggressive posterior retinopathy of prematurity?]. *Ophthalmologe*. 2015;112(6):520-4.
265. Han J, Kim SE, Lee SC, Lee CS. Low dose versus conventional dose of intravitreal bevacizumab injection for retinopathy of prematurity: a case series with paired-eye comparison. *Acta Ophthalmol*. 2016.
266. Harder BC, von Baltz S, Jonas JB, Schlichtenbrede FC. Intravitreal low-dosage bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(6):577-81.
267. Luttj GA, McLeod DS, Bhutto I, Wiegand SJ. Effect of VEGF trap on normal retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy in the dog. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4039-47.
268. Xu L, Lu T, Tuomi L, Jumbe N, Lu J, Eppler S, et al. Pharmacokinetics of ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration: a population approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(3):1616-24.
269. Lu JF, Bruno R, Eppler S, Novotny W, Lum B, Gaudreault J. Clinical pharmacokinetics of bevacizumab in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;62(5):779-86.
270. GCP-Verordnung vom 9. August 2004 (BGBl. I S. 2081), die zuletzt durch Artikel 8 des Gesetzes vom 19. Oktober 2012 (BGBl. I S. 2192) geändert worden ist.



271. Starlinger P, Alidzanovic L, Schauer D, Brugger P, Sommerfeldt S, Kuehrer I, et al. Platelet-stored angiogenesis factors: clinical monitoring is prone to artifacts. *Dis Markers*. 2011;31(2):55-65.
272. Niers TM, Richel DJ, Meijers JC, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factor in the circulation in cancer patients may not be a relevant biomarker. *PLoS One*. 2011;6(5):e19873.
273. Schlingemann RO, Van Noorden CJ, Diekmann MJ, Tiller A, Meijers JC, Koolwijk P, et al. VEGF levels in plasma in relation to platelet activation, glycemic control, and microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1629-34.
274. Yoshida I, Shiba T, Taniguchi H, Takahashi M, Murano T, Hiruta N, et al. Evaluation of plasma vascular endothelial growth factor levels after intravitreal injection of ranibizumab and aflibercept for exudative age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(9):1483-9.
275. Wang X, Sawada T, Sawada O, Saishin Y, Liu P, Ohji M. Serum and plasma vascular endothelial growth factor concentrations before and after intravitreal injection of aflibercept or ranibizumab for age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*. 2014;158(4):738-44 e1.
276. Grierson R, Meyer-Rusenberg B, Kunst F, Berna MJ, Richard G, Thill M. Endothelial progenitor cells and plasma vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor-1 during ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013;29(6):530-8.
277. Wu FP, Hoekman K, Meijer S, Cuesta MA. VEGF and endostatin levels in wound fluid and plasma after breast surgery. *Angiogenesis*. 2003;6(4):255-7.
278. Svendsen MN, Brunner N, Christensen IJ, Ytting H, Bentsen C, Lomholt AF, et al. Biological variations in plasma VEGF and VEGFR-1 may compromise their biomarker value in colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010;70(7):503-11.
279. Carneiro AM, Costa R, Falcao MS, Barthelmes D, Mendonca LS, Fonseca SL, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab. *Acta Ophthalmol*. 2012;90(1):e25-30.
280. Zehetner C, Kirchmair R, Huber S, Kralinger MT, Kieselbach GF. Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(4):454-9.
281. Enders P, Muether PS, Hermann M, Ristau T, Fauser S. Long-term alterations of systemic vascular endothelial growth factor levels in patients treated with ranibizumab for age-related macular degeneration. *Retina*. 2015;35(3):454-8.
282. Walz JM, Boehringer D, Deissler HL, Faerber L, Goepfert JC, Heiduschka P, et al. Pre-Analytical Parameters Affecting Vascular Endothelial Growth Factor Measurement in Plasma: Identifying Confounders. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145375.
283. Liu PM, Fang PC, Huang CB, Kou HK, Chung MY, Yang YH, et al. Risk factors of retinopathy of prematurity in premature infants weighing less than 1600 g. *Am J Perinatol*. 2005;22(2):115-20.
284. Manzoni P, Maestri A, Leonessa M, Mostert M, Farina D, Gomirato G. Fungal and bacterial sepsis and threshold ROP in preterm very low birth weight neonates. *J Perinatol*. 2006;26(1):23-30.

285. Bharwani SK, Dhanireddy R. Systemic fungal infection is associated with the development of retinopathy of prematurity in very low birth weight infants: a meta-review. *J Perinatol.* 2008;28(1):61-6.
286. Chan JJ, Lam CP, Kwok MK, Wong RL, Lee GK, Lau WW, et al. Risk of recurrence of retinopathy of prematurity after initial intravitreal ranibizumab therapy. *Sci Rep.* 2016;6:27082.
287. Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Archives of ophthalmology.* 2012;130(8):1000-6.
288. Wang ZH, Gao PF, Bai H, Li YY. Postnatal weight gain in very low birth weight infants in Beijing and the risk of retinopathy of prematurity. *Int J Ophthalmol.* 2015;8(6):1207-10.
289. Thomas K, Shah PS, Canning R, Harrison A, Lee SK, Dow KE. Retinopathy of prematurity: Risk factors and variability in Canadian neonatal intensive care units. *J Neonatal Perinatal Med.* 2015;8(3):207-14.
290. Slidsborg C, Jensen A, Forman JL, Rasmussen S, Bangsgaard R, Fledelius HC, et al. Neonatal Risk Factors for Treatment-Demanding Retinopathy of Prematurity: A Danish National Study. *Ophthalmology.* 2016;123(4):796-803.
291. Alajbegovic-Halimic J, Zvizdic D, Alimanovic-Halilovic E, Dodik I, Duvnjak S. Risk Factors for Retinopathy of Prematurity in Premature Born Children. *Med Arch.* 2015;69(6):409-13.
292. Karkhaneh R, Khodabande A, Riazi-Eafahani M, Roohipoor R, Ghassemi F, Imani M, et al. Efficacy of intravitreal bevacizumab for zone-II retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol.* 2016.
293. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, et al. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):147 e1-8.
294. Hartmann RC, Auditore JV, Jackson DP. Studies on thrombocytosis. I. Hyperkalemia due to release of potassium from platelets during coagulation. *J Clin Invest.* 1958;37(5):699-707.
295. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis.* 2003;6(4):283-7.
296. Aguilar-Mahecha A, Kuzyk MA, Domanski D, Borchers CH, Basik M. The effect of pre-analytical variability on the measurement of MRM-MS-based mid- to high-abundance plasma protein biomarkers and a panel of cytokines. *PLoS One.* 2012;7(6):e38290.
297. Holmstrom G, Hellstrom A, Jakobsson P, Lundgren P, Tornqvist K, Wallin A. Evaluation of new guidelines for ROP screening in Sweden using SWEDROP - a national quality register. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(3):265-8.
298. Haines L, Fielder AR, Baker H, Wilkinson AR. UK population based study of severe retinopathy of prematurity: screening, treatment, and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(3):F240-4.
299. Yoon JM, Shin DH, Kim SJ, Ham DI, Kang SW, Chang YS, et al. Outcomes after Laser Versus Combined Laser and Bevacizumab Treatment for Type 1 Retinopathy of Prematurity in Zone I. *Retina.* 2016.
300. Karna P, Muttineni J, Angell L, Karmaus W. Retinopathy of prematurity and risk factors: a prospective cohort study. *BMC Pediatr.* 2005;5(1):18.

301. Askie LM, Henderson-Smart DJ, Ko H. Restricted versus liberal oxygen exposure for preventing morbidity and mortality in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(1):CD001077.
302. Ying GS, Quinn GE, Wade KC, Repka MX, Baumritter A, Daniel E, et al. Predictors for the development of referral-warranted retinopathy of prematurity in the telemedicine approaches to evaluating acute-phase retinopathy of prematurity (e-ROP) study. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(3):304-11.
303. Park SW, Jung HH, Heo H. Fluorescein angiography of aggressive posterior retinopathy of prematurity treated with intravitreal anti-VEGF in large preterm babies. *Acta Ophthalmol*. 2014;92(8):810-3.
304. Mintz-Hittner HA, Geloneck MM, Chuang AZ. Clinical Management of Recurrent Retinopathy of Prematurity after Intravitreal Bevacizumab Monotherapy. *Ophthalmology*. 2016.
305. Stahl A, Lagreze WA, Agostini HT. [Pathogenesis of retinopathy of prematurity]. *Ophthalmologe*. 2012;109(12):1174-81.
306. Husain SM, Sinha AK, Bunce C, Arora P, Lopez W, Mun KS, et al. Relationships between maternal ethnicity, gestational age, birth weight, weight gain, and severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr*. 2013;163(1):67-72.
307. Hellstrom A, Ley D, Hansen-Pupp I, Niklasson A, Smith L, Lofqvist C, et al. New insights into the development of retinopathy of prematurity--importance of early weight gain. *Acta paediatrica*. 2010;99(4):502-8.
308. Lofqvist C, Hansen-Pupp I, Andersson E, Holm K, Smith LE, Ley D, et al. Validation of a new retinopathy of prematurity screening method monitoring longitudinal postnatal weight and insulinlike growth factor I. *Archives of ophthalmology*. 2009;127(5):622-7.
309. Wu C, Lofqvist C, Smith LE, VanderVeen DK, Hellstrom A, Consortium W. Importance of early postnatal weight gain for normal retinal angiogenesis in very preterm infants: a multicenter study analyzing weight velocity deviations for the prediction of retinopathy of prematurity. *Archives of ophthalmology*. 2012;130(8):992-9.
310. Gupta MP, Chan RV, Anzures R, Ostmo S, Jonas K, Chiang MF, et al. Practice Patterns in Retinopathy of Prematurity Treatment for Disease Milder Than Recommended by Guidelines. *American journal of ophthalmology*. 2016;163:1-10.
311. Spandau U. What is the optimal dosage for intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity? *Acta Ophthalmol*. 2013;91(2):e154.
312. Hard AL, Hellstrom A. On the use of antiangiogenetic medications for retinopathy of prematurity. *Acta paediatrica*. 2011;100(8):1063-5.
313. Avery RL. Bevacizumab (Avastin) for retinopathy of prematurity: wrong dose, wrong drug, or both? *J AAPOS*. 2012;16(1):2-4.
314. Kall A. Is Avastin the right choice of treatment for retinopathy of prematurity? *Acta paediatrica*. 2012;101(8):796-8.
315. Chhablani J, Rani PK, Balakrishnan D, Jalali S. Unusual adverse choroidal reaction to intravitreal bevacizumab in aggressive posterior retinopathy of prematurity: the Indian Twin Cities ROP screening (ITCROPS) data base report number 7. *Semin Ophthalmol*. 2014;29(4):222-5.

316. Harder BC, Schlichtenbrede FC, von Baltz S, Jendritza W, Jendritza B, Jonas JB. Intravitreal bevacizumab for retinopathy of prematurity: refractive error results. *American journal of ophthalmology*. 2013;155(6):1119-24 e1.
317. Gunay M, Sekeroglu MA, Bardak H, Celik G, Esenulku CM, Hekimoglu E, et al. Evaluation of Refractive Errors and Ocular Biometric Outcomes after Intravitreal Bevacizumab for Retinopathy of Prematurity. *Strabismus*. 2016;24(2):84-8.
318. Kaakour AH, Hansen ED, Aziz HA, Young RC, Berrocal AM. Changing Treatment Patterns of ROP at a Tertiary Medical Center Between 2002 and 2012. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina*. 2015;46(7):752-4.
319. Lorenz B, Stieger K, Jager M, Mais C, Stieger S, Andrassi-Darida M. RETINAL VASCULAR DEVELOPMENT WITH 0.312 MG INTRAVITREAL BEVACIZUMAB TO TREAT SEVERE POSTERIOR RETINOPATHY OF PREMATURETY: A Longitudinal Fluorescein Angiographic Study. *Retina*. 2017;37(1):97-111.
320. Isaac M, Tehrani N, Mireskandari K, Medscape. Involution patterns of retinopathy of prematurity after treatment with intravitreal bevacizumab: implications for follow-up. *Eye (Lond)*. 2016;30(3):333-41.
321. Chen SN, Lian I, Hwang YC, Chen YH, Chang YC, Lee KH, et al. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment for retinopathy of prematurity: comparison between Ranibizumab and Bevacizumab. *Retina*. 2015;35(4):667-74.
322. Rawlings JS, Scott JS. Postconceptional age of surviving preterm low-birth-weight infants at hospital discharge. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1996;150(3):260-2.
323. Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet*. 2017;390(10104):1770-80.
324. Tsai MH, Hsu JF, Chu SM, Lien R, Huang HR, Chiang MC, et al. Incidence, clinical characteristics and risk factors for adverse outcome in neonates with late-onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(1):e7-e13.
325. Kelly DA. Intestinal failure-associated liver disease: what do we know today? *Gastroenterology*. 2006;130(2 Suppl 1):S70-7.
326. Wu WC, Lien R, Liao PJ, Wang NK, Chen YP, Chao AN, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor and related factors after intravitreal bevacizumab injection for retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol*. 2015;133(4):391-7.
327. Kong L, Bhatt AR, Demny AB, Coats DK, Li A, Rahman EZ, et al. Pharmacokinetics of bevacizumab and its effects on serum VEGF and IGF-1 in infants with retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(2):956-61.
328. dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol*. 2005;66(2):175-91.
329. Zimmermann R, Koenig J, Zingsem J, Weisbach V, Strasser E, Ringwald J, et al. Effect of specimen anticoagulation on the measurement of circulating platelet-derived growth factors. *Clin Chem*. 2005;51(12):2365-8.
330. Sun Y, Liegl R, Gong Y, Buhler A, Cakir B, Meng SS, et al. Sema3f Protects Against Subretinal Neovascularization In Vivo. *EBioMedicine*. 2017;18:281-7.