

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

Interaktion von VEGF-Inhibitoren mit der Thrombozyten- Funktion

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Golenko, geb. Klein, Judith Viola

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Ziemssen
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Akhavan-Sigari

Tag der Disputation: 15.03.2021

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Der endotheliale Wachstumsfaktoren VEGF	2
1.2 Therapeutischer Einsatz der VEGF-Inhibitoren	3
Bevacizumab	3
Ranibizumab.....	4
Aflibercept.....	4
Nebenwirkungen und Pharmakokinetik	5
1.3 VEGF-Inhibitoren und arterielle thromboembolische Ereignisse	7
1.4 Die Suszeptibilität der Patienten	10
1.5 Thrombozyten-Aktivierung.....	10
1.6 Thrombozytäre Oberflächenmarker	15
GP IIb/IIIa	15
CD62P	15
SDF-1	16
1.7 Fragestellung.....	16
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie	18
2.2 Thrombozyten-Isolation	20
2.3 Inkubation und Aktivierung der Thrombozyten	21
2.4 Messung der Proben in der Durchflusszytometrie	25
2.5 ImageStream® MK II bildgebendes Durchflusszytometer	25
2.6 Statistische Auswertung	26
2.7 Material.....	26
3 Ergebnisse	27
3.1 Experimente ohne Aktivierung der Thrombozyten	27
Einfluss von Aflibercept oder seiner Lösung.....	27
Einfluss von Rituximab	30
3.2 Experimente mit Aktivierung der Thrombozyten	32

	Einfluss von Aflibercept oder seiner Lösung vor Aktivierung von Thrombozyten.....	32
	Thrombin als Agonist.....	32
	PAR-4-AP als Agonist.....	34
	Einfluss von Rituximab vor Aktivierung von Thrombozyten	37
	Messung von Aflibercept-FITC nach Aktivierung der Thrombozyten ...	38
4	Diskussion	42
4.1	Hauptbeobachtungen	42
4.2	Ruhende, nicht aktivierte Thrombozyten	43
4.3	Aktivierte Thrombozyten	44
4.4	Limitationen	49
4.5	Schlussfolgerung	50
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis.....	53
7	Anhang	61
7.1	Material.....	61
	Medikamente und -lösungen	61
	Agonisten.....	61
	Fluoreszierende Immunglobuline.....	61
	Geräte.....	62
	Institute	62
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	63
9	Veröffentlichungen	64
	Danksagung.....	65

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom (<i>engl.</i> acute coronary syndrome)
ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APTC	Studiengruppe zu Thrombozytenhemmern (<i>engl.</i> anti-platelet trialists' collaboration)
ATE	Arterielle thromboembolische Ereignisse
CD62P	Thrombozyten-Selektin (<i>engl.</i> cluster of differentiation 62 P)
CNV	choroidale Neovaskularisation
CVD	Herz-Kreislauf-Erkrankung (<i>engl.</i> cardiovascular disease)
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CRP	C-reaktives Protein
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtslichtstreuung (<i>engl.</i> forward scatter)
GP	Glykoprotein
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>engl.</i> mean fluorescent intensity)
MSI	mittlerer Stimulationsindex (<i>engl.</i> mean stimulation index)
NaCl	Natriumchlorid
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor (<i>engl.</i> proteinase-activated receptor)
PAR-4-AP	Agonist des Protease-aktivierter-Rezeptor-4 (<i>engl.</i> proteinase-activated receptor 4-activating peptide)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PIGF	Plazenta-Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> placental growth factor)

PLT	Thrombozytenzahl (<i>engl.</i> platelet-count)
PMT	Photomultiplier-Röhre (<i>engl.</i> photomultiplier-tube)
PPP	Thrombozyten-armes Plasma (<i>engl.</i> Platelet-poor plasma)
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma (<i>engl.</i> Platelet-rich plasma)
RR	relatives Risiko
SDF-1	Stromazellen abgeleiteter Faktor 1 (<i>engl.</i> Stromal-cell-derived factor 1)
SSC	Seitwärtslichtstreuung (<i>engl.</i> side scatter)
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierende Proteine (<i>engl.</i> thrombin receptor-activating peptide)
UE	unerwünschtes Ereignis
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
VEGF	Gefäßendothel-Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)
VEGFR	Gefäßendothel-Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor)
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine der häufigsten Erblindungsursachen in den westlichen Industrienationen. Die Erkrankung gewinnt auf Grund der steigenden Lebenserwartung noch immer mehr an Bedeutung (Krause et al., 2013, Keane et al., 2015). Im späten Stadium der Erkrankung kann es zu einem ausgeprägten Verlust der zentralen Sehschärfe kommen, wodurch Lesefähigkeit und Selbständigkeit stark beeinträchtigt sind (Finger et al., 2007). Grundsätzlich unterscheidet man die neovaskuläre Form mit Blutungen, Exsudaten und Netzhautschwellung von der häufigeren Form mit fortschreitender Atrophie der äußeren Netzhaut und des Pigmentepithels (Meyer et al., 2008). Das Einwachsen neuer Blutgefäße, eine sogenannten choroidale Neovaskularisation (CNV) aus der Aderhaut unter und in die Netzhaut, kann zu einer schnellen Schädigung der zentralen Netzhaut führen (Finger et al., 2011). Die Spätphase beider Erkrankungen bedeutet nicht selten eine Erblindung im Sinne des Gesetzes. Die pathologischen Gefäße mit vaskulärer Leckage verursachen eine Flüssigkeitsansammlung unter und in der Netzhaut, häufig im Bereich der Fovea, also dem Netzhautareal mit der höchsten Rezeptordichte. Für die Pathophysiologie der neovaskulären AMD ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) mit seiner angiogenen und permeabilitätssteigernden Wirkung von großer Bedeutung (Ferrara et al., 2007).

Um der Schädigung der Stelle des schärfsten Sehens entgegen zu wirken, hat die Therapie eine Hemmung des Wachstums der CNV und der begleitenden Exsudation zum Ziel (Meyer et al., 2008). Seit 2006 wurden in Europa VEGF-Inhibitoren eingesetzt. Durch die regelmäßige Gabe von Molekülen in den Glaskörper, die sämtliche Isoformen von VEGF binden können, werden das Wachstum, das begleitende Ödem und die assoziierten Blutungen günstig beeinflusst, allerdings ohne dass die Ursache der Erkrankung und die begleitende Atrophie-Komponente beeinflusst werden. Dennoch konnte die Rate an Neuerblindungen erfreulicherweise in den letzten Jahren durch diese Therapie deutlich reduziert werden (Minassian et al., 2011, Campbell et al., 2012, Bourne et al., 2014).

1.1 Der endotheliale Wachstumsfaktoren VEGF

Neben VEGF sind auch noch die Angiopoietine und Ephrine spezifische Wachstumsfaktoren für das Gefäßendothel (Yancopoulos et al., 2000). Zusätzlich sind für die Gefäßformation noch weitere unspezifische Wachstumsfaktoren notwendig. VEGF ist jedoch von entscheidender Bedeutung, da es das Aussprossen der Blutgefäße initiiert. Neben der Proliferation des Gefäßendothels fördert es auch die Permeabilität und eine vaskuläre Leckage. Außerdem spielt VEGF auch eine zentrale Rolle für das Wachstum und die extrazelluläre Anbindung von Tumoren.

VEGF-A gilt als Hauptregulator der normalen und pathologischen Angiogenese und ist eine wichtige Zielstruktur bei der Therapie der neovaskulären AMD (Ferrara et al., 2007). Endothelzellen stellen die primäre Zielstruktur von VEGF-A dar. Neben VEGF-A gibt es auch noch VEGF- B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und den plazentaren Wachstumsfaktor (PlGF).

VEGF bindet an der Zelloberfläche an VEGF-Rezeptoren (VEGFR) (siehe Abb. 1), sogenannte Tyrosinkinase-Rezeptoren (Lemmon and Schlessinger, 2010). Tyrosinkinase-Rezeptoren beinhalten über 20 Subgruppen und sind von wesentlicher Bedeutung für viele verschiedene Zellabläufe wie Differenzierung und Proliferation; neben VEGFR binden z. B. auch epidermale Wachstumsfaktoren und Stammzell-Faktoren an Rezeptoren dieser Familie. Tyrosinkinase-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Region, an die ein Ligand binden kann. Diese ist über eine transmembrane Helix mit einer zytoplasmatische Tyrosinkinase verbunden. Durch Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren, es folgt die Aktivierung des Signalweges.

VEGFR-2 ist hauptursächlich für die VEGF-A vermittelte Angiogenese und Permeabilitätssteigerung, neben VEGF-A bindet hier auch VEGF-C und D (Ferrara et al., 2007). VEGFR-1 hat eine inhibierende Funktion, VEGFR-3 scheint für die Lymphangiogenese von Bedeutung zu sein (Yancopoulos et al., 2000).

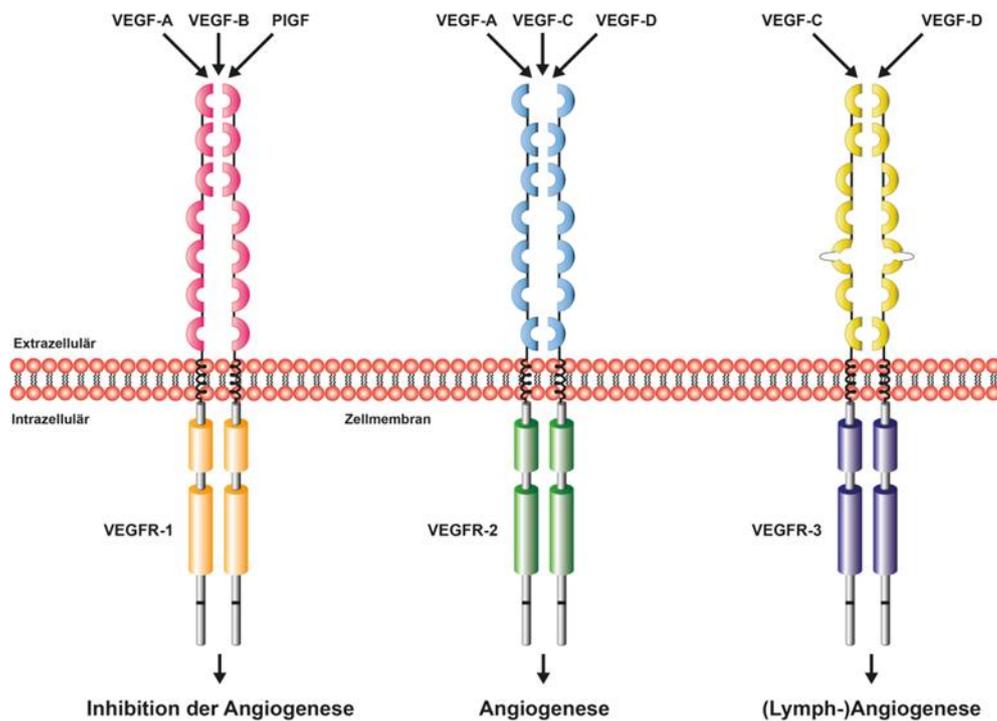


Abb. 1: VEGFR aus der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren (modifiziert nach Smith et al., 2015)

Schematische Darstellung der VEGFR. VEGFR-1 bindet VEGF-A, VEGF-B und PlGF und hat eine regulierende und inhibierende Funktion. VEGFR-2 bindet VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D, eine Aktivierung führt zur Angiogenese. VEGFR-3 reguliert im Wesentlichen die Lymphangiogenese und bindet VEGF-C und VEGF-D (Smith et al., 2015).

1.2 Therapeutischer Einsatz der VEGF-Inhibitoren

Für die Therapie der neovaskulären AMD werden in Deutschland vorwiegend folgende drei VEGF-Inhibitoren verwendet.

Bevacizumab

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®; Genentech Inc; Roche, Basel, Switzerland) wurde für den Einsatz in der Krebstherapie entwickelt, fand jedoch früh als *off-label*-Präparat Einzug in die Augenheilkunde, weil andere Wirkstoffe mit vergleichbarer Wirksamkeit noch nicht zugelassen oder verfügbar waren (Rosenfeld et al., 2005). Obwohl nicht von der FDA (*Food and Drug*

Administration) zur Behandlung der neovaskulären AMD zugelassen, wurde der Wirkstoff auch aus Kostengründen sehr häufig eingesetzt (Thomas et al., 2013).

Ranibizumab

Ranibizumab (Lucentis®; Genentech Inc, South San Francisco, CA, USA; Novartis International AG) wurde 2006 von der FDA zugelassen (Thomas et al., 2013). Ranibizumab stellt ein Antikörper-Fragment dar. Ranibizumab wird intravitreal als Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml verabreicht, dementsprechend enthält eine Einzeldosis von 0,05 ml 0,5 mg Ranibizumab (Novartis Pharma, 2007). Zu Beginn der Therapie wurde meist eine dreimalige, monatliche Dosis verabreicht (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, 2015). Anschließend wurden Behandlung und Kontrolle der morphologischen Läsionsaktivität angepasst.

Die Wirksamkeit von Ranibizumab wurde in den Zulassungsstudien MARINA und ANCHOR belegt (Rosenfeld et al., 2006, Brown et al., 2009).

Aflibercept

Der jüngste VEGF-Inhibitor zur Behandlung der neovaskulären AMD ist Aflibercept (Eylea®; Bayer Pharma, Berlin, Germany), welcher im November 2011 von der FDA zugelassen wurde (Thomas et al., 2013). Vorausgegangen waren dabei zwei randomisierte doppelt verblindete Phase-III-Studien, die VIEW1 und VIEW2 (VEGF Trap-Eye: Investigation of Efficacy and Safety in Wet Age-Related Macular Degeneration) (Heier et al., 2012).

Der VEGF-Inhibitor Aflibercept ist ein rekombinantes Fusionsprotein (Browning et al., 2012). Das Protein besteht aus extrazellulären Anteilen des humanen VEGFR-1 und des humanen VEGFR-2 gebunden an die Fc-Region des humanen Immunglobulins G (IgG) 1 (siehe Abb. 2). In Form eines löslichen Rezeptors besitzt der Wirkstoff so die Fähigkeit, die Faktoren VEGF-A, VEGF-B, PlGF1 und PlGF2 mit hoher Affinität zu binden und ihren Effekt zu verhindern. Im Vergleich zu Ranibizumab und Bevacizumab hat Aflibercept eine höhere Affinität zu den Endothelwachstumsfaktoren und bindet als Alleinstellungsmerkmal auch VEGF-B und PlGF (Papadopoulos et al., 2012).

Aflibercept wird intravitreal als Lösung mit einer Konzentration von 40 mg/ml verabreicht (Bayer Pharma, 2012). Eine Einzeldosis mit 0,05 ml enthält somit 2 mg Aflibercept. Zur Behandlung der neovaskulären AMD werden zu Beginn drei monatliche Injektionen verabreicht, anschließend werden Behandlung und Kontrolle der morphologischen Läsionsaktivität angepasst (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft, 2015). Des Weiteren wird Aflibercept bei Erwachsenen zur Therapie nach retinalem Venenverschluss, diabetesbedingtem Makulaödem und Myopie-bedingter CNV eingesetzt, wobei zum Teil andere Wiederbehandlungsstrategien verfolgt werden (European Medicines Agency, 2015).

Nebenwirkungen und Pharmakokinetik

Als sehr häufige Nebenwirkungen nach der Gabe der Wirkstoffe sind Blutungen der Bindehaut und Augenschmerzen genannt worden (Bayer Pharma, 2012, Falavarjani and Nguyen, 2013). Weitere häufige Phänomene waren Glaskörperabhebung, Katarakt, Glaskörperschlieren und erhöhter Augeninnendruck. Die meisten dieser beobachteten Ereignisse dürften aber größtenteils zum einen der Altersstruktur der behandelten Menschen geschuldet sein, zum anderen auf die Injektionsprozedur zurückgeführt werden und wurden für sämtliche Präparate beschrieben (Falavarjani and Nguyen, 2013).

Es ist davon auszugehen, dass Aflibercept aus dem Glaskörper in den systemischen Kreislauf diffundiert, ohne wesentlich metabolisiert oder verändert zu werden (Stewart, 2012): Im Blut hat ungebundenes Aflibercept eine Halbwertszeit (HWZ) von 1-3 Tagen, an VEGF gebundenes Aflibercept zeigte eine HWZ von 18 Tagen. Letztendlich bildet Aflibercept mit VEGF Komplexe und wird durch Proteolyse und glomeruläre Filtration abgebaut (Stewart, 2012).

Zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms wurde Aflibercept (Zaltrap®; 4 mg/kg zweiwöchentlich, Sanofi-Aventis, Germany) intravenös als Zweitlinientherapie in Kombination mit der Chemotherapie FOLFIRI (5-Fluorouracil, Leucovorin, Irinotecan) verwendet (Sinicrope et al., 2013). Die zusätzliche Affinität von Aflibercept zu PIGF kann hier besonders von Bedeutung sein, da PIGF das Tumorwachstum über die Bildung von VEGFR-1 fördert (Yao et al., 2011).

Laut der VIEW-Studien sind Ranibizumab und Aflibercept bezüglich Sicherheit und Wirksamkeit vergleichbar, die Medikamente werden gleich gut toleriert (Heier et al., 2012). Eine Analyse der *Cochrane Collaboration* bestätigte dies, bemängelte jedoch die limitierte Aussagekraft der Studien in Bezug auf seltene Ereignisse (Sarwar et al., 2016).

Bevacizumab wurde in mehreren randomisiert kontrollierten Studien mit Ranibizumab verglichen. CATT (USA), IVAN (Großbritannien), GEFAL (Frankreich) und LUCAS (Norwegen) fanden keine wesentlichen Unterschiede zu den zugelassenen Wirkstoffen im Hinblick auf die klinische Wirksamkeit auf die neovaskuläre AMD (Martin et al., 2012, Chakravarthy et al., 2013, Kodjikian et al., 2013, Berg et al., 2015).

Allerdings wurden auch einzelne Unterschiede in den Studien oder einzelnen Subgruppen beschrieben. So gab es z. B. Hinweise in der CATT- und IVAN-Studie auf ein erhöhtes Auftreten schwerwiegender systemischer unerwünschter Ereignisse (UE) unter Bevacizumab (Ziemssen et al., 2016). Des Weiteren wurden auch die Unterschiede des strukturellen Aufbaus und der Halbwertszeit diskutiert (Avery et al., 2014). So wurde beobachtet, dass Ranibizumab relativ schnell aus dem Serum eliminiert wird, Bevacizumab und Aflibercept länger verbleiben, was innerhalb von 30 Tagen mit einem starken Abfall des im Serum frei vorliegendem VEGFs verbunden war.

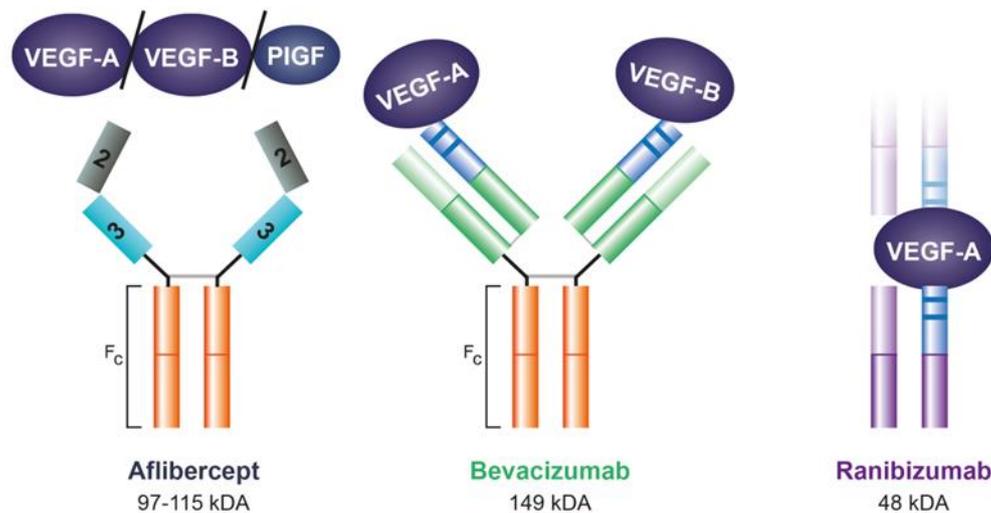


Abb. 2: Der strukturelle Aufbau der VEGF-Inhibitoren (modifiziert nach Ziemssen et al., 2016)

Aflibercept besteht aus der Fc-Region eines Antikörpers gekoppelt an extrazelluläre Anteile des humanen VEGFR-1 und -2, wodurch VEGF-A, VEGF-B und PlGF gebunden werden können. Bevacizumab besteht ebenfalls aus einer Fc-Region, Ranibizumab nur aus einem Fab-Fragment, beide binden VEGF-A über ihre variablen Regionen; adaptiert nach (Ziemssen et al., 2016).

1.3 VEGF-Inhibitoren und arterielle thromboembolische Ereignisse

Unter arteriellen thromboembolischen Ereignisse (ATEs) versteht man Thrombus-bedingte Embolien im arteriellen Blutkreislauf. Hierbei orientieren sich Studien häufig an der Einteilung und Definition der *anti-platelet trialists' collaboration* (APTCC) (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). Als Endpunkte wurden von der APTCC folgende ATEs genannt: nicht-tödlicher Schlaganfall (ischämisch und hämorrhagisch), nicht-tödlicher Myokardinfarkt und Tod durch kardiovaskuläre, hämorrhagische und unbekannte Ursachen (Baron et al., 2008). Vorab bleibt anzumerken, dass sich ophthalmologische Studien häufig auf relativ kleine Fallzahlen beschränken. So wurden in die VIEW1- und VIEW2-Studie jeweils weniger als 1300 Patienten aufgenommen, mit ca. 300 Patienten pro Behandlungsgruppe (Heier et al., 2012). Jedoch ist die Fallzahl von besonderer

Bedeutung für die Aussagekraft einer Studie (Schumacher and Schulgen-Kristiansen, 2008): Umso mehr Patienten in eine Studie eingeschlossen werden, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, kleine Unterschiede nachweisen zu können. Bei zu kleinen Stichproben werden bestehende Unterschiede möglicherweise nicht erkannt (Metzler and Krause, 1997). Die statistische Power ist von der Fallzahl abhängig (Cohen, 1992).

Insgesamt wurden nach einer Metaanalyse ernste Nebenwirkungen und systemische thromboembolische Ereignisse häufiger nach Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab beobachtet im Vergleich mit einem Placebo (Schmid et al., 2015). Es wurden Hinweise mit moderater Evidenz gefunden, dass schwerwiegende systemische UE nach Aflibercept und Ranibizumab in vergleichbarer Häufigkeit auftreten (Sarwar et al., 2016).

Laut der Fachinformation von Aflibercept (Eylea®) besteht ein potenzielles Risiko, dass systemische Nebenwirkungen inklusive nicht-okulärer Hämorrhagien und arterieller thromboembolischer Ereignisse im Zusammenhang mit der VEGF-Hemmung stehen können (Bayer Pharma, 2012). Die *European Medicines Agency* warnt vor einer Anwendung bei Patienten, welche innerhalb der letzten 6 Monate einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt erlitten haben (European Medicines Agency, 2012). Die Daten der VIEW1- und VIEW2-Studie lassen keine dosis-abhängigen Nebenwirkungen erwarten, es zeigte sich kein Unterschied bzgl. UEs in den verschiedenen Dosierungsgruppen (Heier et al., 2012). Des Weiteren wird angegeben, dass die Inzidenz von ATEs in den VIEW-Studien mit 5 % für Ranibizumab und 5,1 % für Aflibercept mit vergleichbarer Häufigkeit auftraten (Beaumont et al., 2014). Die ATEs beinhalten hier vaskulären Tod, nicht-tödlichen Myokardinfarkt und nicht-tödlichen Schlaganfall beinhalten (Heier et al., 2012). Die unter dem Namen „zerebrovaskuläre Ereignisse“ zusammengefassten UE waren jedoch signifikant erhöht (Beaumont et al., 2014). ATEs traten unter Aflibercept nach einem signifikant kürzeren Zeitintervall auf. In einer populationsbezogenen Analyse mit über 50.000 Patienten im Alter von 65 Jahren oder älter konnte nach initialer Behandlung mit Ranibizumab oder Bevacizumab ein signifikanter Anstieg thromboembolischer Ereignisse von

jährlich 10,7 auf 18,6 pro 1000 Patienten ermittelt werden, wobei vorwiegend ischämische Schlaganfälle die Zunahme ausmachten (Schlenker et al., 2015).

In der CATT-Studie wurde ein Unterschied bzgl. gastrointestinaler Funktionsstörungen auffällig, welche auch gastrointestinale Blutungen beinhalteten: Unter Behandlung mit Ranibizumab wurden 11, unter Bevacizumab 28 verzeichnet, davon zwei bzw. sieben gastrointestinale Blutungen (Ahfat and Zaidi, 2013). Anzumerken bleibt die Gruppengröße von ca. 600 Patienten pro Gruppe (Martin et al., 2012). Dieser Unterschied wurde durch eine Cochrane-Analyse, eine systematische Übersichtsarbeit mit über 3500 Patienten, bestätigt (Moja et al., 2014). Auch hier zeigte sich lediglich ein höheres Risiko für gastrointestinale Funktionsstörungen unter intravitrealer Anwendung von Bevacizumab im Vergleich zu Ranibizumab. Betont wurde jedoch auch die unpräzise Evidenz der Studienlage. Grundsätzlich bedarf es Studien, die die Patienten deutlich länger als zwei Jahre begleiten, um größere Aussagekraft in Bezug auf das vollständige Sicherheitsprofil zu erreichen.

In der Tumorthherapie war das Risiko hämorrhagischer Ereignisse laut einer Metaanalyse unter einer Therapie mit Aflibercept vergleichbar mit dem unter der Therapie mit Bevacizumab; bei soliden Tumoren wurde Aflibercept mit einem erhöhten Risiko der Entstehung eines hämorrhagischen Ereignisses in Zusammenhang gebracht (Peng et al., 2014). Des Weiteren traten schwerwiegende bis lebensbedrohlich eingestufte unerwünschte Ereignisse, einschließlich ATEs, unter der Therapie von Aflibercept mit FOLFIRI häufiger auf als bei der Therapie von FOLFIRI mit Placebo (Van Cutsem et al., 2012).

Eine weitere Metaanalyse aus 16 klinischen Studien zeigte ein erhöhtes Risiko für tödliche Blutungen unter Therapie mit Bevacizumab bei Krebspatienten (Ranpura et al., 2011). Auch ein signifikant erhöhtes Risiko, ein zerebrovaskuläres Ereignis zu erleiden, incl. zentralnervöse Blutungen oder Ischämien, wurde für Krebspatienten unter Therapie mit Bevacizumab beschrieben (Zuo et al., 2014).

1.4 Die Suszeptibilität der Patienten

Ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten und die Progression der AMD ist das Alter (Brandl et al., 2016). Die Prävalenz der AMD innerhalb der kaukasischen Bevölkerung steigt ab dem 50. Lebensjahr exponentiell an (Schrader, 2006). Über 4,5 Mio. Menschen sind in Deutschland von der AMD betroffen, jeder Vierte aller über 65-Jährigen. Die Prävalenz in Deutschland wurde mit 11,9 % für die frühe AMD und 0,2 % für die späte AMD beschrieben (Brandl et al., 2016). Bis zu 2 % aller 70-Jährigen und 5 % aller 80-Jährigen waren von der späten AMD betroffen (Schrader, 2006). Dabei werden in Deutschland jährlich 35.000 Neuerkrankungen vermutet (Pauleikhoff et al., 2009).

Bereits 1995 wurde eine Assoziation der AMD mit der Atherosklerose gefunden (Vingerling et al., 1995). Des Weiteren haben epidemiologische Studien belegt, dass Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD) wie Alter, ethnische Zugehörigkeit, Adipositas, Rauchen, Bluthochdruck und hohes Cholesterin auch mit einem erhöhten Risiko für eine AMD verbunden sind (Wu et al., 2014). Auch das C-reaktive Protein (CRP) als unabhängiger Risikofaktor für CVD wird ebenfalls in Zusammenhang mit der AMD gebracht. Für die Spätform der AMD wurde ein um 66 % höheres Risiko einer CVD angegeben. Die AMD geht nicht nur mit einem erhöhten Risiko der Gesamtmortalität einher, sondern es wurde im Besonderen auch ein erhöhtes relatives Risiko (RR) beschrieben, an einer Herz-Kreislauf-Erkrankung zu sterben, an der Koronaren Herzkrankheit zu erkranken oder einen Schlaganfall zu erleiden (Wang et al., 2016). Für die einzelnen Studien ist kritisch zu prüfen, ob die Gruppen mit einer erhöhten Empfindlichkeit für Risiken z. B. wegen kardiovaskulärer Begleiterkrankungen in ausreichender Zahl eingeschlossen waren. Die Untersuchung gesünderer Patienten könnte die Auswirkungen der Exposition von VEGF-Inhibitoren unterschätzen.

1.5 Thrombozyten-Aktivierung

Thrombozyten sind die wesentlichen Akteure der Hämostase (Pötzsch and Gawaz, 2010, S. 62-69, 82-86). Normalerweise verhindert intaktes Endothelgewebe und dessen anti-thrombotische Faktoren wie Prostazykline und

Stickstoffmonoxid eine Thrombusbildung. Für den Fall einer Gefäßverletzung ist die Thrombusbildung jedoch sinnvoll und erforderlich.

Thrombozyten enthalten drei Arten an sekretorischen Granula (siehe Tab. 1) (Dame et al., 2006). α -Granula machen den Hauptanteil aus. Sie enthalten verschiedene Proteine, welche sowohl durch Synthese entstehen, als auch aus dem Blut aufgenommen werden: adhäsive Glykoproteine (GP) wie der von-Willebrand-Faktor (vWF) und Fibrinogen, anti- und prokoagulatorische Faktoren und Membranproteine wie das Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P, *cluster determinant 62P*) und das GP IIb/IIIa (Pötzsch and Gawaz, 2010, S. 62-69, 82-86). Auch das Chemokin SDF-1 α (*stromal cell derived factor-1 α*) ist in α -Granula enthalten. Elektronenmikroskopisch dichte δ -Granula machen 10 % der Granula aus und enthalten Serotonin, was zu einer Thrombozyten-Aktivierung und Vasokonstriktion führt (Dame et al., 2006). Durch die Freisetzung von ADP, was ebenfalls Thrombozyten aktiviert, kommt es zu einem positiven Feedback und damit zu einer zweiten, vollständigen Aktivierung. Lysosomale λ -Granula dienen vermutlich ebenfalls der Wundheilung.

Tab.: 1: Sekretorische Thrombozyten-Granula und ihre Charakteristika (Zieger et al., 2018, Jurk and Kehrel, 2010, Rendu and Brohard-Bohn, 2001, Dame et al., 2006)

	Anzahl und Größe	Inhalt
α -Granula	40-80 pro Thrombozyt 200-500 nm	Membrangebundene Proteine z. B. P-Selektin, G IIb/IIIa Lösliche Proteine z. B. vWF, Fibrinogen, Thrombospondin, Faktor V
δ -Granula	3-9 pro Thrombozyt ca. 200 nm	Amine (Serotonin, Histamin), Nukleotide (ADP, ATP, GTP, GDP), Pyrophosphat, Calcium, Magnesium
λ -Granula	vereinzelt 175-250 nm	Proteasen und Glykohydrolasen

Die Membran der Thrombozyten besitzt verschiedene Oberflächenrezeptoren, wobei die meisten Glykoproteine sind (Dame et al., 2006). Diese Rezeptoren sind wesentliche Bestandteile der Adhäsion und Aggregation (siehe Abb. 3). Einige Rezeptoren binden aktivierende Substanzen wie ADP oder Thrombin, andere Rezeptoren binden an Matrixproteine wie Kollagenfilamente. Für die Hämostase von besonderer Bedeutung ist das GP IIb/IIIa. Dieser sogenannte Fibrinogen-Rezeptor verändert bei Aktivierung seine Konformation und verbindet das Zytoskelett der Thrombozyten mit Fibrin. Die „*outside-in*“-Aktivierung durch Fibrinogen wird ergänzt durch eine „*inside-out*“-Aktivierung, welche mittels Signalkaskaden nach Aktivierung anderer Glykoproteine einsetzt. Neben Fibrin bindet GP IIb/IIIa auch andere Liganden wie z. B. den vWF. Auch das GP Ib/IX/V, der sogenannte vWF-Rezeptor, ist wesentlich für die Blutstillung.

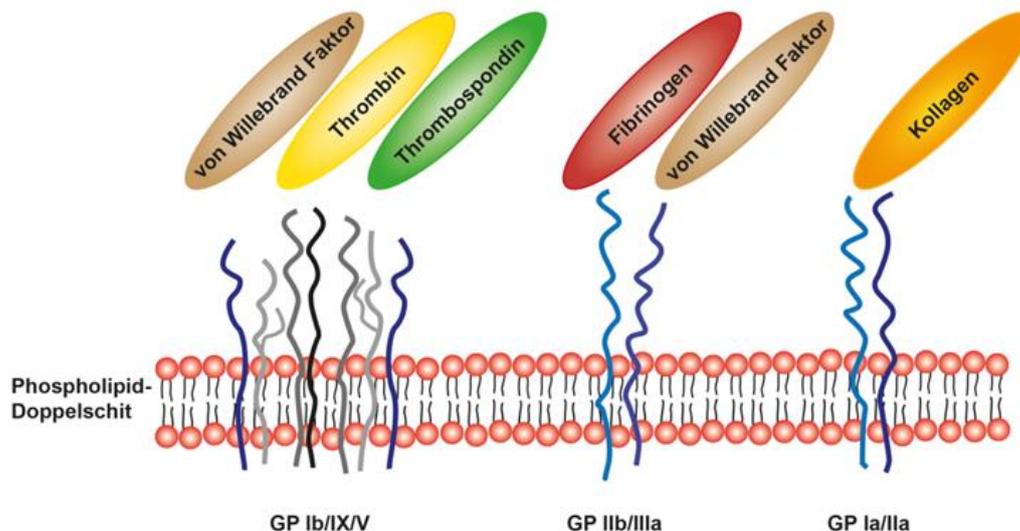


Abb. 3: Glykoproteine der Thrombozyten-Membran und ihre Liganden (modifiziert nach Dame et al., 2006)

Von links nach rechts sind die Rezeptoren GP Ib/IX/V, GP IIb/IIIa und GP Ia/IIa und ihre korrespondierenden Liganden abgebildet. Alle drei Glykoproteine sind von wesentlicher Bedeutung beim Ablauf der primären Hämostase (Dame et al., 2006).

Findet eine Gewebeschädigung statt, kommen die Rezeptoren der Thrombozyten mit subendothelialen Proteinen und Kollagen in Kontakt (Dame et al., 2006). Durch Bindung von GP Ia/IIa an Kollagen und GP Ib/IX/V an den vWF kommt es zur Adhäsion an der Gefäßwand (siehe Abb. 4). Die Thrombozyten werden aktiviert und sezernieren ADP und Thrombin. Die Thrombozyten verändern ihre Konformation und bilden Pseudopodien aus. Durch einen Exozytose-Prozess fusioniert die Granula-Membran mit der Plasmamembran und die in den Granula enthaltenen Glykoproteine und Rezeptoren werden auf der Thrombozyten-Oberfläche präsentiert (Pötzsch and Gawaz, 2010, S. 62-69, 82-86), so auch der Aktivierungsmarker P-Selektin (Dame et al., 2006). Die Thrombozyten aggregieren, durch Aktivierung des GP IIb/IIIa, was die Thrombozyten über Fibrinogen vernetzt, wird die Aggregation irreversibel.

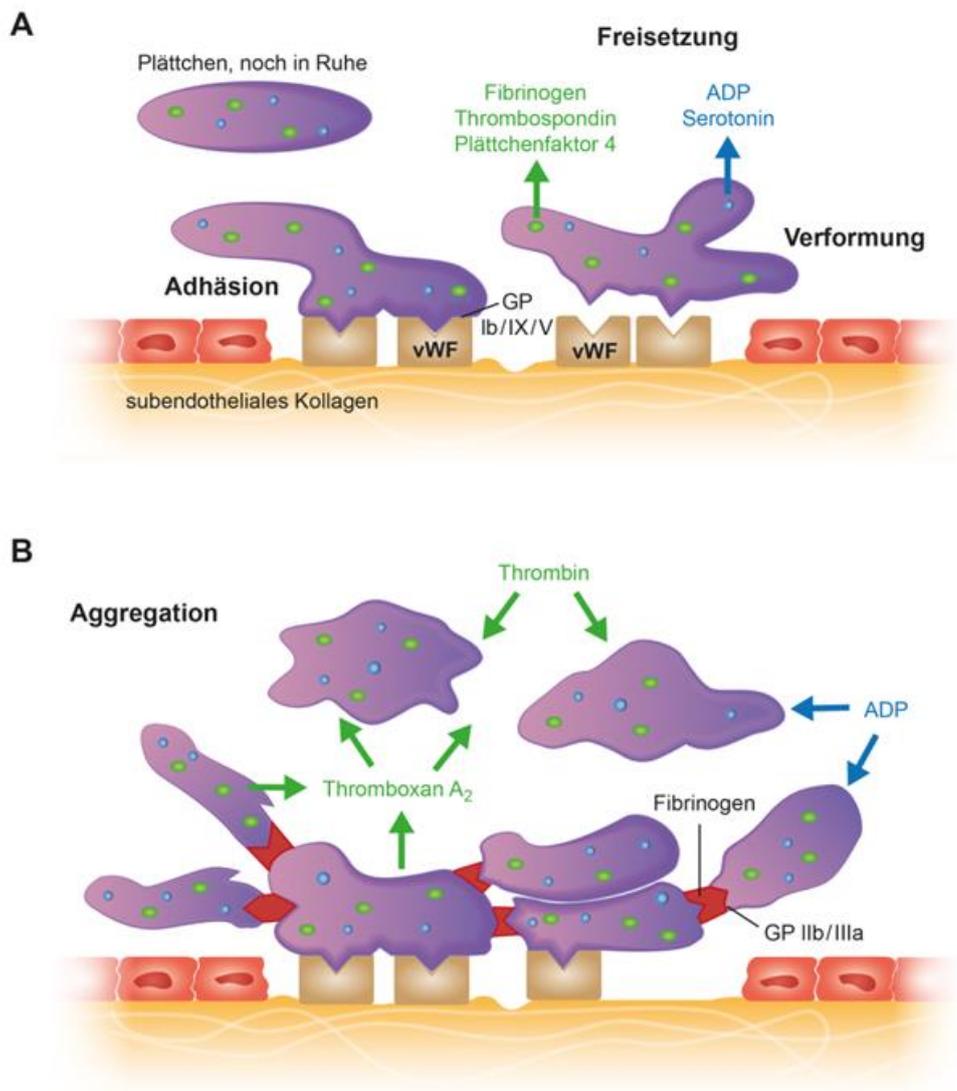


Abb. 4: Die Aktivierung der Thrombozyten (modifiziert nach Schmidt et al., 2011, S. 493)

Die Adhäsion erfolgt mittels Bindung an Kollagen und vWF, es folgt die Freisetzung der Granula und die Verformung der Thrombozyten. Mittels des Rezeptors GP IIb/IIIa können Thrombozyten über Fibrinogen vernetzt werden. Die Aggregation wird durch Thrombin, ADP und Thromboxan A₂ stimuliert (Schmidt et al., 2011, S. 491-495).

1.6 Thrombozytäre Oberflächenmarker

Um die Aktivierung der Thrombozyten beurteilen zu können, kann die Expression verschiedener Oberflächenproteine mittels Durchflusszytometrie quantitativ erfasst werden (Kamath et al., 2001, Sobolewska et al., 2015).

GP IIb/IIIa

GP IIb/IIIa, auch bekannt als Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, wurde mit einer Anzahl von 80.000 pro Thrombozyt als häufigster Thrombozytenrezeptor der thrombozytären Zellmembran identifiziert (Zieger et al., 2018). GP IIb/IIIa wird ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert. Es besteht aus zwei transmembranösen Einheiten, die bei der Degranulation der Thrombozyten aus den α -Granula freigesetzt und auf der Plasmamembran präsentiert werden (Dame et al., 2006). Dadurch kann die Verfügbarkeit des GP IIb/IIIa auf der Thrombozyten-Oberfläche um 30-50 % gesteigert werden. Nach Aktivierung durch Bindung von Fibrinogen, dem „*outside-in*“-Signal folgt eine Signalkaskade und der Fibrinogen-Rezeptor verändert seine Konformation („*inside-out*“). Nach der Konformationsänderung stellt er einen hoch-affinen Fibrinogen-Rezeptor dar und sorgt für eine irreversible Thrombozyten-Aggregation. Neben Fibrinogen bindet GP IIb/IIIa auch vWF und andere prothrombotische Liganden. Des Weiteren scheint eine verstärkte Oberflächenpräsentation von GP IIb/IIIa auch als unabhängiger prädiktiver Biomarker ein erhöhtes Risiko anzuzeigen, einen rezidivierenden Schlaganfall zu erleiden (Fateh-Moghadam et al., 2007).

CD62P

Das P-Selektin wird vor allem in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert (Merten and Thiagarajan, 2004). Es dient zur Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten. Der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 der Leukozyten bindet an CD62P und die Leukozyten bilden Aggregate mit den Thrombozyten. Durch Produktion von prokoagulativen Mikropartikeln der Leukozyten wird die Neigung zur Gerinnung verstärkt. Des Weiteren können P-Selektine mit thrombozytären Sulfatiden interagieren, dadurch werden die über Fibrinbrücken gebildeten Thrombozyten-Aggregate weiter stabilisiert. Insgesamt beteiligt sich das thrombozytäre P-Selektin mit GP IIb/IIIa an der Initiierung der

Thrombozytenaggregation (Théorêt et al., 2006). Für das P-Selektin wurde außerdem eine Bedeutung als relevanter Biomarker für das Ausmaß der Schädigung durch ischämische Schlaganfälle gefunden (Hasan et al., 2012). Eine verstärkte Expression des Proteins wurde außerdem für das Akute Koronarsyndrom (ACS) berichtet (Stellos et al., 2010).

SDF-1

Die α -Granula stellen eine große Quelle des SDF-1 dar, auch bekannt unter CXCL12 (Chatterjee and Gawaz, 2013). Nach der Thrombozyten-Aktivierung durch einen Agonisten kommt es zur Freisetzung und SDF-1 wird verstärkt an der Plättchen-Oberfläche präsentiert. Der Hauptrezeptor CXCR4 wird u.a. von Thrombozyten selbst exprimiert (autokrine Stimulation). Durch SDF-1 können zudem CD34-positive Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden und zu ischämischen Arealen wandern (Stellos et al., 2008). Dort können sie mit Thrombozyten interagieren und u.a. zur Differenzierung der Endothelzellen beitragen. Des Weiteren wurde über eine erhöhte Plättchen-abhängige Oberflächenexpression von SDF-1 beim ACS berichtet, womit SDF-1 eventuell ein relevanter Biomarker für ein kardiovaskuläres Risiko sein könnte (Wurster et al., 2013).

1.7 Fragestellung

Obwohl VEGF-Inhibitoren die Rate an Neuerblindungen und fortgeschrittenen Erkrankungsstadien positiv beeinflussen können, müssten randomisierte Studien mit größeren Fallzahlen erfolgen, um sichere Aussagen zu thromboembolischen und kardiovaskulären Nebenwirkungen nach der Intervention treffen zu können. Das Fusionsprotein Aflibercept enthält wie Bevacizumab die Fc-Region eines Antikörpers und hat auch daher eine längere systemische Halbwertszeit als das kleinere Molekül Ranibizumab (Avery et al., 2014). Die zugelassenen Wirkstoffe enthalten Einschränkungen für den Einsatz in der Frühphase nach einem vaskulären Ereignis (European Medicines Agency, 2012). Für den Fall thromboembolischer Komplikationen kann im individuellen Einzelfall noch nicht abgeschätzt werden, ob und welche Rolle ein VEGF-Inhibitor eingenommen hat. Hierfür müssten präexistente Risiken innerhalb der Studienkohorten bedacht

werden. Es sind vereinzelt Zusammenhänge zwischen der intravitrealen Therapie und dem Auftreten arterieller thromboembolischer Events beschrieben worden, in deren Rahmen der ATEs eine Aktivierung des zellulären Gerinnungssystems stattfinden kann (Jennings, 2009). Bisher wurden keine Daten zur Expression der Oberflächenproteine von Thrombozyten wie GP IIb/IIIa, P-Selektin oder SDF-1 erhoben, die auch als Biomarker für Schlaganfälle von Bedeutung sein könnten (Fateh-Moghadam et al., 2007, Hasan et al., 2012, Wurster et al., 2013).

Es stellt sich die Frage, in wie weit eine Interaktion zwischen den intravitreal verabreichten Dosen von Aflibercept und den Thrombozyten im systemischen Kreislauf vorliegen könnte. Es ist unklar, welche zellulären Mechanismen durch die Exposition gegenüber dem Fusionsprotein Aflibercept auftreten. Falls ein Einfluss auf das Gerinnungssystem vorliegen würde, könnten lokale Konzentrationen der VEGF-Inhibitoren pro- oder antikoagulatorische Auswirkungen haben: Für das strukturell sehr ähnliche Bevacizumab wurde ein auffällig erhöhtes Risiko von Blutungen beschrieben (Ahfat and Zaidi, 2013). In der Krebstherapie wurden unter Aflibercept zusätzlich auch ATEs registriert (Van Cutsem et al., 2012).

Eine mögliche direkte Interaktion von Aflibercept mit Thrombozyten sollte hier evaluiert werden. Dafür sollten erst einmal Thrombozyten junger, gesunder Probanden verwendet werden, um andere Einflüsse (Vorerkrankungen, Medikation) ausschließen zu können. Um die Spezifität der Ergebnisse auf Aflibercept zurückführen zu können, sollten außerdem Kontrollversuche mit kompletten Antikörpern vorgenommen werden. Als geeignete Kontrollgruppe sollte auch die Formulierung der Lösung ohne Wirkstoff als Einflussfaktor in Betracht gezogen werden.

In dieser experimentellen Arbeit wurde die Aktivierung auf zellulärer Ebene mittels Durchflusszytometrie untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der intravitrealen Anwendung von Aflibercept und dem Entstehen von ATEs besser beurteilen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein etabliertes optisches Verfahren zur zellulären Diagnostik (Sack, 2007). Neben Größe und Granularität kann auch die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen ermittelt werden (siehe Abb. 5). Für das Verfahren wird meist im Voraus eine fluoreszierende Färbung der Zellen vorgenommen. Dafür macht man sich u.a. fluoreszente monoklonale Antikörper zu Nutze. Das sind Antikörper, welche mit Fluorochrome konjugiert wurden und dann an bestimmte zelluläre Strukturen z. B. Oberflächenrezeptoren binden. Somit ist der fluoreszierende Farbstoff indirekt an die Zelle gebunden. Die Antikörper werden passend zu den Antigenen ausgewählt, welche mittels der Durchflusszytometrie quantifiziert werden sollen. In dieser Arbeit wurden die Oberflächenproteine GP IIb/IIIa, P-Selektin und SDF-1 gemessen.

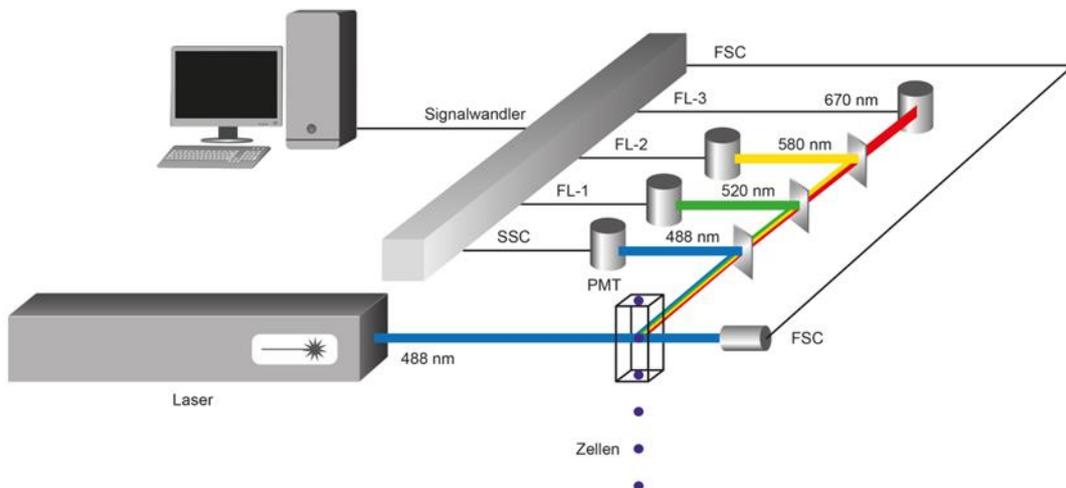


Abb. 5: Prinzip eines Durchflusszytometer (modifiziert nach Sack, 2007, S.30)

Der Laserstrahl trifft im rechten Winkel auf die einzelnen Zellen aus der Probe. Es wird sowohl die Vorwärtslichtstreuung (FSC) als auch die Seitwärtslichtstreuung (SSC) gemessen. Des Weiteren wird die jeweilige Immunofluoreszenz von den mit FL-1, FL-2 und FL-3 benannten Photomultipliern (PMTs) detektiert und anschließend in ein elektrisches Signal zur Datenspeicherung umgewandelt (Sack, 2007).

Beim Messverfahren wird zur Analyse ein Laserstrahl als monochromatische Lichtquelle eingesetzt (Sack, 2007). Die Zellen aus der Probensuspension werden dann im Gerät von einem sog. Hüllstrom, eine für das Gerät geeignete Flüssigkeit, umspült. Dies ermöglicht, dass die Zellen in einer Reihe Zelle für Zelle einzeln und zentriert am Laserstrahl vorbeigeführt werden. Am Messpunkt trifft dann der Laserstrahl im rechten Winkel auf die Zellen.

Zur Analyse wird sowohl a) die Streuung des Anregungslichts als auch b) die Immunofluoreszenz gemessen.

- a) Die Lichtstreuung findet durch Brechung und Reflektion des Anregungslichts statt (Erotocritou et al., 2007). Hierbei kann die Seitwärtslichtstreuung (SSC, *engl. side scatter*) und die Vorwärtslichtstreuung (FSC, *engl. forward scatter*) unterschieden werden. Die SSC ist Licht, welches im rechten Winkel zum Laserstrahl von der Zelle abgelenkt wird. Die Intensität korreliert mit der Granularität der Zelle. Die FSC dient als Maß der Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit. Gemessen wird ein Lichtsignal, welches im kleinen Winkel zum Laserstrahl von der Zelle abgelenkt wird, also in der Achse des Laserstrahls oder nahe 180° vom Auftreffen des Laserstrahls auf der Zelle entfernt ist. Zusätzlich können an Hand der SSC und FSC lebende von toten Zellen unterschieden werden.
- b) Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert das kurzwellige, energiereiche Licht, wandelt es um und strahlt es als längerwelliges, energieärmeres Licht wieder ab (Erotocritou et al., 2007). Jedes Fluorochrom hat ein bestimmtes Emissionsspektrum, in dessen Bereich sich die Abstrahlungsenergie befindet, welche als eine bestimmte Farbe sichtbar wird. Photodioden detektieren das Fluoreszenzlicht der einzelnen Zellen in einer Photomultiplier-Röhre (PMT, *engl. photomultiplier tube*) und wandeln es in elektronische Signale um, welche abgespeichert werden (Sack, 2007). Die PMTs werden mit FL1, FL2, FL3 usw. benannt, in aufsteigender Wellenlänge des von ihnen detektierten Fluoreszenzlichts. FL1 detektiert ein Abstrahlungslicht der Wellenlänge 515-545 nm, die Farbe Grün, FITC (Fluoresceinisothiocyanat) dient als Fluorochrom (Erotocritou et al., 2007). FL2 detektiert gelb-oranges

Abstrahlungslicht der Wellenlänge 564-606 nm, PE (Phycoerythrin) dient als Fluorochrom. Beide Fluorochrome wurden in dieser Arbeit verwendet (siehe Abb. 6). Die Intensität der Lichtsignale korreliert in Abhängigkeit von der Art der Färbung mit der Menge der zellulär gebundenen monoklonalen Antikörper und ist somit ein Maß für die zellulären Antigene (Sack, 2007).

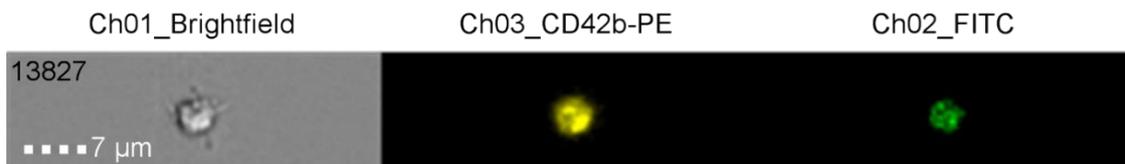


Abb. 6: Aufnahmen einer Zelle ohne und mit Fluoreszenz

Die linke Aufnahme (Ch01_Brightfield) stellt einen Thrombozyten im Hellfeld dar, die Aufnahme des Thrombozyten wurde im Durchlicht ohne Anregung durch den Laserstrahl gemacht, somit ist die Morphologie der Zelle gut ersichtlich. In der mittleren Aufnahme (Ch03_CD42b-PE) sieht man einen mit PE markierten Thrombozyten, dessen Fluoreszenz nach Anregung mit dem Laserstrahl gelb erscheint. Die rechte Aufnahme (Ch02_FITC) stellt einen mit FITC gekennzeichneten Thrombozyten dar, dessen abstrahlendes Fluoreszenzlicht grün erscheint. Die Abbildung zeigt die von uns während der Messungen im ImageStream® verwendeten Fluoreszenzen und Kanäle.

Die Daten, die durch Mehrfachmessung einzelner Zellen zustande kommt, dienen zur Auswertung (Sack, 2007). Die Darstellung der erhobenen Daten erfolgte vorwiegend mittels Histogramm oder Dot Plot (Erotocritou et al., 2007). Im Histogramm ist die Darstellung eindimensional, die x-Achse zeigt die Fluoreszenzintensität, die Zellzahl wird auf der y-Achse dargestellt. Im Dot Plot wurden die Daten als Punktwolke zweidimensional dargestellt. Jeder Punkt symbolisierte eine Zelle, angeordnet werden die Punkte auf der x- und y-Achse nach zwei Signalintensitäten, eine Korrelation wird ersichtlich. Durch Voreinstellungen kann ein sog. Gate bestimmt werden, in dem die Messung stattfindet. Dadurch wird sichergestellt, dass nur die Messung der gewünschten Zielpopulation zur Auswertung dient.

2.2 Thrombozyten-Isolation

Für die experimentellen Arbeiten wurde venöses Blut gesunder kaukasischer Probanden aus der Antekubitalvene entnommen. Die Teilnahme der Probanden

erfolgte freiwillig, Kriterium für die Eignung war die körperliche Gesundheit der Probanden und der Ausschluss einer Einnahme von Medikamenten wie nicht-steroidaler Antirheumatika in den vorhergehenden zehn Tagen. Unter anderem sollte die Anamnese sicherstellen, dass von einer unbeeinträchtigten Funktion der Thrombozyten ausgegangen werden durfte. Für die Blutentnahme wurde eine CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) -Monovette (SARSTEDT AG & Co. KG) verwendet. Nach der Blutentnahme erfolgte unverzüglich eine erste Zentrifugation. Zentrifugiert wurde für 10 min bei Raumtemperatur mit 1000 rpm. Anschließend wurde 1 ml Plasma, das sogenannte *Platelet-Rich Plasma* (PRP, thrombozytenreiches Plasma), mit einer Pipette von der Schicht oberhalb des Leukozytenfilms aus der Monovette abgetragen. Von dem gewonnenen PRP wurden 500 µl für die Experimente abpipettiert und zwei Proben mit je 100 µl zur Messung der Thrombozytenzahl (*Platelet-count*, PLT) erstellt. Gemessen wurde mit einem vollautomatischen Blutzellmessgerät (Axon Lab AG Reichenbach/Stuttgart, Deutschland). Dabei wurde der Mittelwert der PLTs beider gemessener Proben errechnet. War dieser $< 200 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ so wurde das gewonnene PRP direkt für die Versuche verwendet. War der PLT $> 200 \cdot 10^3/\text{mm}^3$, so wurde die Blutentnahme in der Monovette ein zweites Mal für 10 min bei Raumtemperatur mit 3500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde erneut Plasma, jetzt das *Platelet-Poor Plasma* (PPP, thrombozytenarmes Plasma) mit einer Pipette von oben aus der Monovette abgetragen. Dies wurde zur Resuspension des PRP verwendet, so dass trotz unterschiedlicher Probanden stets eine einheitliche Thrombozyten-Konzentration des Plasmas für die Experimente gewährleistet war.

2.3 Inkubation und Aktivierung der Thrombozyten

Nachdem die Thrombozyten isoliert waren, wurden die Proben der Versuche hergestellt. Um die Isolation einer Thrombozyten-Population zu überprüfen, wurden zu Beginn der Experimente bei einigen Versuchen Proben mit CD42b-PE (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) angefärbt, sowie mit den Immunglobulinen IgG1-FITC (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) und IgG1-PE (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) als Isotypkontrollen.

Es wurde darauf geachtet, dass die Herstellung der Proben innerhalb von 3 h ab Blutentnahme abgeschlossen war. Jede Probe wurde in einem für die Durchflusszytometrie geeignetem Reagenzglas, einem FACS®-Röhrchen, hergestellt. Das Volumen jeder Probe betrug 50 µl.

Insgesamt wurden Versuche mit fünf verschiedenen Konzentrationen von Aflibercept (Eylea® Bayer Pharma, Berlin, Deutschland) durchgeführt, die Thrombozyten waren somit Konzentrationen von 4 mg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml und 40 ng/ml ausgesetzt. Dabei wurden die jeweiligen Lösungen durch Verdünnung mit PBS hergestellt. Äquivalent dazu wurden diese Experimente auch mit der Aflibercept-Lösung in allen fünf Konzentrationen durchgeführt (siehe Tab. 2 und Tab. 3). Die Lösung wurde dabei in Anlehnung an die Herstellerangaben von Aflibercept aus 164 mg Na₃PO₄, 23 mg NaCl, 0,5 g Saccharose und 0,3 µg Polysorbate in 10 ml PBS hergestellt und auf einen pH-Wert von 6,2 eingestellt. Beide Experimente wurden ohne Agonist, als auch mit Agonist durchgeführt. Als Agonisten wurden insgesamt Thrombin (0,02 U/ml; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), *proteinase-activated receptor 4-activating peptide* (PAR-4-AP) (25 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und *thrombin receptor-activating peptide-6* (TRAP) (25 µM; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Für PAR-4-AP wurde eine Bindung an den Rezeptor *proteinase-activated receptor 4* (PAR-4) angenommen, für TRAP wurde eine Bindung an *proteinase-activated receptor 1* (PAR-1) angenommen, die zu einer Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation führen (Chung et al., 2002). Für Thrombin wurde eine Wirkung vorwiegend über PAR-1 und PAR-4 beschrieben. Für den Einsatz eines Agonisten wurde eine Präinkubation von 10 min oder 30 min mit dem Medikament Aflibercept bzw. dessen Lösung durchgeführt.

Tab. 2: Übersicht der Probenherstellung (von l. n. r.) stimulierter Proben mit aktivierten Thrombozyten:

Stimulierte Proben mit aktivierten Thrombozyten					
PBS	5 µl PRP	5 µl Aflibercept Inkubationszeit 10 min	5 µl Agonist	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
				PBS	
PBS	5 µl PRP	5 µl Aflibercept Inkubationszeit 30 min	5 µl Agonist	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
				PBS	
PBS	5 µl PRP	5 µl Lösungsmittel Inkubationszeit 10 min	5 µl Agonist	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
				PBS	
PBS	5 µl PRP	5 µl Lösungsmittel Inkubationszeit 30 min	5 µl Agonist	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
				PBS	

Tab. 3: Übersicht der Probenherstellung (von l. n. r.) nicht stimulierter Proben mit nicht-aktivierten Thrombozyten:

Nicht stimulierte Proben mit nicht-aktivierten Thrombozyten				
PBS	5 µl PRP	5 µl Aflibercept	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
			PBS	
PBS	5 µl PRP	5 µl Lösungsmittel	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
			PBS	

Um die Spezifität der beobachteten Phänomene bewerten zu können, wurden Kontrollversuche mit dem IgG1- Antikörper Rituximab (Roche Pharma, Basel, Schweiz) gemacht. Rituximab bindet an das CD20-Antigen, ein Membranprotein das sich auf B-Lymphozyten befindet (Pescovitz, 2006). Die Versuche wurden in den Konzentrationen 4 mg/ml und 40 ng/ml durchgeführt, verdünnt wurde ausgehend der handelsüblichen Medikamentenlösung mit PBS. Bei diesen Experimenten erfolgten die Versuche ohne Agonist, aber auch mit Thrombin, PAR-4-AP oder TRAP. Vor dem Einsatz eines Agonisten fand wiederum eine 10-minütige Inkubationszeit mit Rituximab statt.

Für die Messung in der Durchflusszytometrie wurden zur Anfärbung die Fluorochrom-konjugierten Immunglobuline PAC-1-FITC (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) (Bindung an GP IIb/IIIa), CD62P-FITC (Beckman Coulter, Marseille, France) (Bindung an das P-Selektin) und SDF-1-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (Bindung an SDF-1) verwendet. Des Weiteren wurde Aflibercept-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), das FITC-konjugierte Medikament, in fünf verschiedenen Konzentrationen bei Versuchen mit den Agonisten eingesetzt, um eine mögliche Interaktion zwischen Aflibercept und den Thrombozyten zu ermitteln.

Bis zur Messung in der Durchflusszytometrie wurden die Proben abgedunkelt und gekühlt (4 °C) gelagert, die Messung erfolgte spätestens 48 Stunden nach Ansetzen der Proben.

Die einzelnen Proben wurden wie folgt hergestellt: Im ersten Schritt wurde eine bestimmte Menge der Trägerlösung phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) in das Reagenzgefäß pipettiert, daraufhin 5 µl des bei Bedarf verdünnten PRPs. Anschließend wurde die Probe mit 5 µl Aflibercept bzw. 5 µl des Lösungsmittels versehen. Nach Gabe von Aflibercept bzw. der Lösung wurden die Proben 10 oder 30 min inkubiert, bevor anschließend ein Agonist zur Stimulation dazu gegeben wurde (siehe Tab. 2). Äquivalent dazu wurden Proben ohne Agonist erstellt (siehe Tab. 3). Für die nicht-stimulierten Kontrollproben wurde PBS verwendet, zusätzlich wurden Proben analysiert, denen lediglich ein Agonist beigefügt wurde (siehe Tab. 4). Abschließend wurden die Proben mit einem fluoreszierenden Antikörper bzw. mit PBS versehen. Nach einer Inkubationszeit von 25 min wurden die Proben mit 300 µl 0,5%ige Paraformaldehydlösung (PFA) versehen, der Aktivitätszustand der Thrombozyten war somit fixiert (Sobolewska et al., 2015).

Tab. 4: Die weitere Probenherstellung (von l. n. r.):

PBS	5 µl PRP	PBS (nicht-stimulierte Kontrollprobe)	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
			PBS	
PBS	5 µl PRP	5 µl Agonist	Fluoreszierender Antikörper	300 µl PFA
			PBS	

2.4 Messung der Proben in der Durchflusszytometrie

Für die Messung der hergestellten Proben wurde ein Becton Dickinson FACSCalibur™ Durchflusszytometer (Serien-Nr. E97500055) verwendet. Dieses beinhaltet eine duale Lasertechnik mit einem 15-mW-Argon-Laser 488 nm und einem 10-mW-Dioden-Laser 633 nm.

Das Gate wurde in dieser Arbeit für die Thrombozyten typische Lichtstreuung definiert. Es wurden jeweils 10.000 Events der von den Thrombozyten ausgehenden Fluoreszenz registriert. Es wurden die Fluorochrome FITC und PE verwendet.

2.5 ImageStream® MK II bildgebendes Durchflusszytometer

Um die in der Durchflusszytometrie gemessenen Parameter zu bestätigen, wurden zusätzlich Messungen mit dem *Imaging Flow Cytometer* durchgeführt. Zusätzlich zu der Durchflusszytometrie konnten dadurch zeitgleich hochauflösende Bilder der gemessenen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen werden (Zuba-Surma et al., 2007). Die Messungen wurden am *ImageStream® MK II* (Amnis®, Seattle, Washington, USA) in der *Image Stream® Core Facility* der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) durchgeführt. 10.000 Zellen pro Probe wurden dabei mit Hilfe der *INSPIRE™ Instrument Controller Software* mit 60facher Vergrößerung und dem 488 nm Laser auf 200 mW akquiriert. Hierbei wurden zusätzlich zu Rituximab sowohl Bevacizumab (2,5 mg/ml, Avastin® Roche, Grenzach, Deutschland) als IgG1-Antikörper als auch Ranibizumab (1 mg/ml, Lucentis® Novartis Pharma GmbH, Deutschland) als Fab-Antikörper-Fragment als Kontrollen eingesetzt.

Die Daten wurden mit *IDEAS® Image Analysis Software* ausgewertet. Einzelfärbungen dienten hierbei als Grundlage zur Erstellung der Kompensationsmatrix, welche dann auf alle Proben angewendet wurde. Für die Auswertung wurden alle Einzelzellen im Fokus eingeschlossen.

2.6 Statistische Auswertung

Zur Auswertung wurde der Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensität verwendet. Durch das Verhältnis von angefärbten Proben zu nicht angefärbten Kontrollproben wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) errechnet. Der mittlere Stimulations-Index (MSI) wiederum wurde durch das Verhältnis der MFI einer stimulierten Probe zu der einer nicht-stimulierten Kontrollprobe definiert. Zur statistischen Auswertung wurden verbundene Stichproben von mindestens drei Probanden verwendet und der Wilcoxon-Test mit Hilfe kommerzieller Software (IBM SPSS Statistics 23, SPSS Inc.) durchgeführt. Die Planung der zu untersuchenden Proben orientierte sich an früheren Untersuchungen mit mindestens drei Experimenten pro Versuchskonstellation (Sobolewska et al., 2015).

Nach der Durchführung der Tests (mit Messwiederholungen) wurden wahrscheinliche Ausreißer nach einem vordefinierten Protokoll identifiziert. Definiert wurde ein Ausreißer als ein Wert, der um einen Faktor fünf vom Mittelwert aller Messwerte einer Probe abwich. Als Parameter für die Streuung und Konsistenz beobachteter Effekte wurde die Standardabweichung (< 50 %) herangezogen. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt, dementsprechend wurden Testergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 als signifikant bewertet (Weiß, 2007).

2.7 Material

Auflistung der Medikamente, -lösungen, Agonisten, fluoreszierenden Immunoglobuline, Geräte und Institute im Anhang (siehe Seite 61 f.).

3 Ergebnisse

Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden bereits im Oktober 2018 in der Fachzeitschrift „*Experimental Eye Research*“ in dem Artikel „*Influence of aflibercept on platelet activation profile*“ veröffentlicht (Sobolewska et al., 2018).

3.1 Experimente ohne Aktivierung der Thrombozyten

Einfluss von Aflibercept oder seiner Lösung

Es wurde sowohl mit Aflibercept als auch mit der Formulierung ohne Wirkstoff in den folgenden Konzentrationen 4 mg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml und 0,04 µg/ml Experimente durchgeführt. Die drei Plättchenmarker GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 zeigten für ruhende Thrombozyten, welche nicht mittels Agonisten aktiviert wurden, minimale Einflüsse.

Nur für die höchste untersuchte Aflibercept-Konzentration fand sich eine signifikant erhöhte Expression von GP IIb/IIIa an der Oberfläche von mit Aflibercept inkubierten Thrombozyten (MW: 0,781; 95 %-KI: 0,622-0,941 vs. MW: 0,544; 95 %-KI: 0,415-0,673; $P < 0,05$) (siehe Abb. 7a). In allen anderen Konzentrationen zeigte die Expression von GP IIb/IIIa unter Einfluss der Lösung im Vergleich zu Aflibercept keine signifikante Veränderung.

GP IIb/IIIa wurde sowohl unter 4 mg/ml Aflibercept (MW: 0,781; 95 %-KI: 0,622-0,941; $P < 0,05$) als auch unter Einfluss des 4 mg/ml Lösungsmittels (MW: 0,572; 95 %-KI: 0,434-0,711; $P < 0,05$) im Vergleich zu PBS (MW: 1,00, 95 %-KI: 1,0-1,0) signifikant schwächer exprimiert. In allen anderen Konzentrationen waren keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

Eine signifikant verstärkte Expression von CD62P wurde bei allen untersuchten Konzentrationen von Aflibercept im Vergleich zu PBS ($P < 0,05$) gemessen, mit Ausnahme von 4 mg/ml. CD62P war in allen Konzentrationen der Lösung ($P < 0,05$), mit Ausnahme von 4 mg/ml und 0,04 µg/ml, signifikant hochreguliert. Zwischen Aflibercept und seinem Lösungsmittel gab es in keiner der fünf untersuchten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 7b).

SDF-1 zeigte keine signifikant veränderte Ausprägung auf der Thrombozyten-Oberfläche mit Ausnahme einer Steigerung nach Inkubation der 40 µg/ml Lösung im Vergleich zu PBS (MW: 1,387; 95 %-KI: 1,122-1,652; P < 0,05).

Zwischen Aflibercept und der Formulierung ohne Wirkstoff gab es in keiner der fünf untersuchten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 7c).

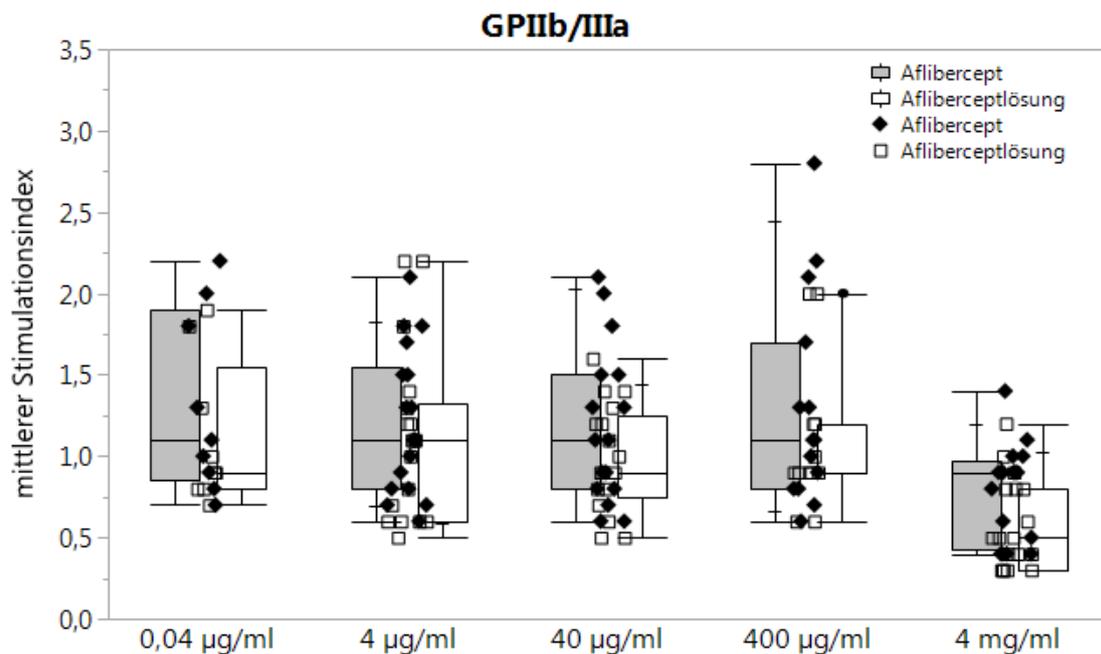


Abb. 7a: GP IIb/IIIa unter Einfluss von Aflibercept und seiner Lösung

Die gemessenen Daten für den Plättchenmarker GP IIb/IIIa sind hier in aufsteigender Konzentration von 0,04 µg/ml bis 4 mg/ml in Form von Boxplots mit Punktwolken dargestellt. Die grau gefärbten Boxplots mit schwarzer Punktwolke stellen den Plättchenmarker GP IIb/IIIa unter Aflibercept dar, die weiß gefüllten Boxplots mit weißer Punktwolke stellen den Plättchenmarker mit der Lösung ohne Wirkstoff dar. Zwischen Aflibercept und dem Lösungsmittel bestand kein signifikanter Unterschied, außer in der höchsten Konzentration: GP IIb/IIIa war unter 4 mg/ml Aflibercept im Vergleich zu der Lösung signifikant hochreguliert (P < 0,05), unter Einfluss von 4 mg/ml Aflibercept und 4 mg/ml der Lösung im Vergleich zu PBS war GP IIb/IIIa signifikant herabreguliert. Alle dargestellten Daten beziehen sich auf den Vergleich mit der Negativkontrolle, ruhende Thrombozyten nach Inkubation mit PBS.

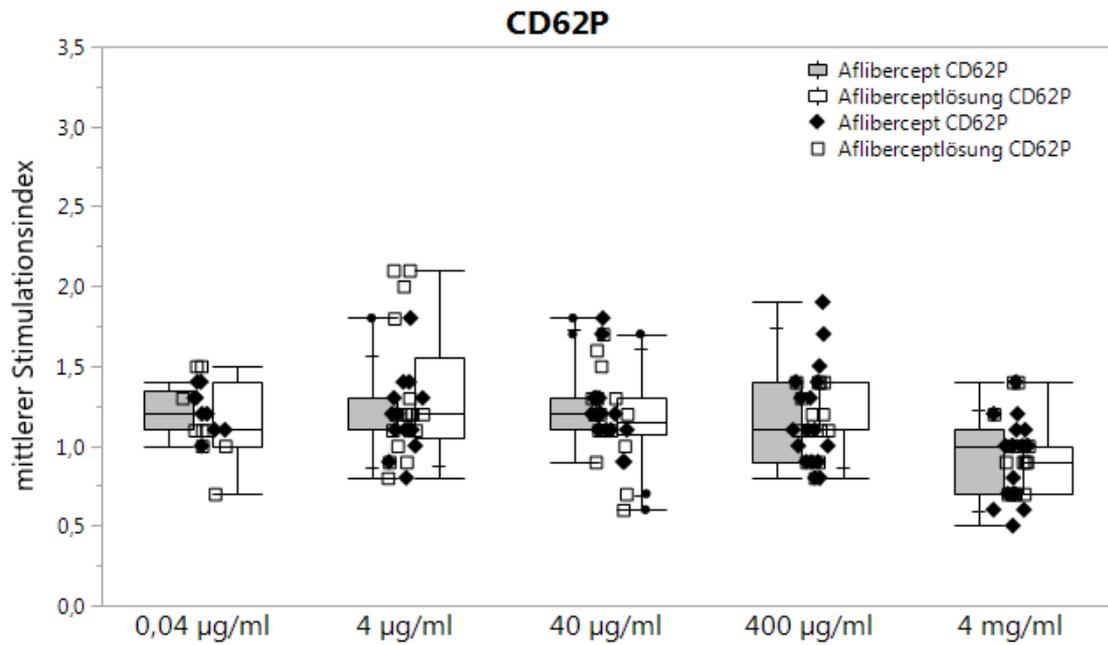


Abb. 7b: CD62P unter Einfluss von Aflibercept und seiner Lösung

Die gemessenen Daten für den Plättchenmarker CD62P sind hier in aufsteigender Konzentration von 0,04 µg/ml bis 4 mg/ml in Form von Boxplots mit Punktwolken dargestellt. Die grau gefärbten Boxplots mit schwarzer Punktwolke stellen den Plättchenmarker CD62P unter Aflibercept dar, die weiß gefüllten Boxplots mit weißer Punktwolke zeigen das Lösungsmittel an. Zwischen Aflibercept und dem Lösungsmittel wurde in keiner der fünf untersuchten Konzentrationen eine signifikant veränderte Expression von CD62P festgestellt. Alle dargestellten Daten beziehen sich auf den Vergleich mit der Negativkontrolle, ruhende Thrombozyten nach Inkubation mit PBS.

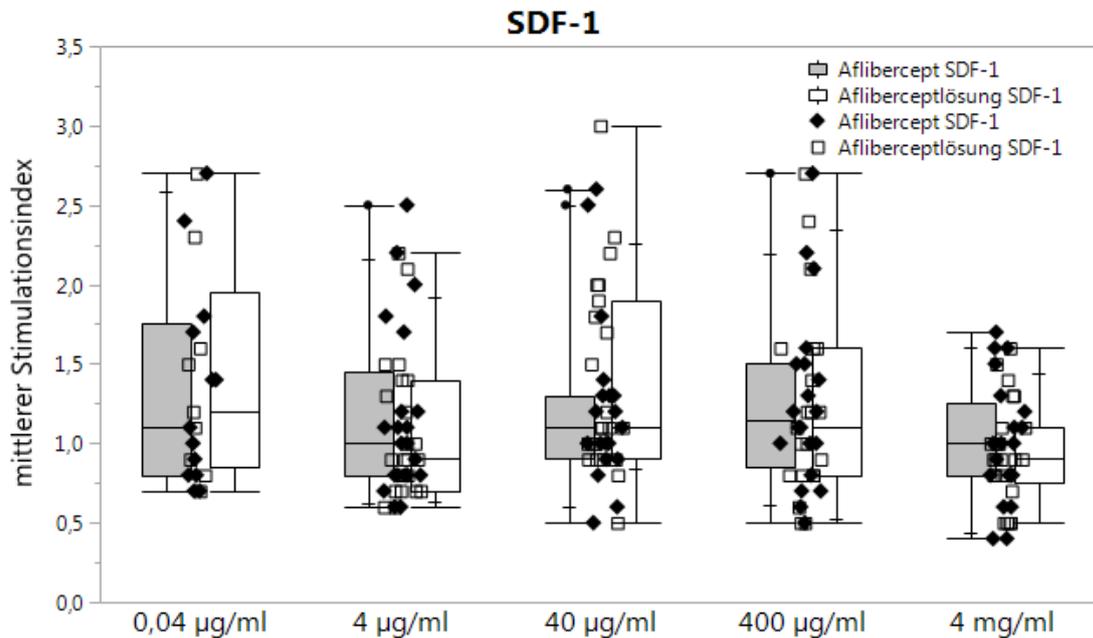


Abb. 7c: SDF-1 unter Einfluss von Aflibercept und seiner Lösung

Die gemessenen Daten für den Plättchenmarker SDF-1 sind hier in aufsteigender Konzentration von 0,04 µg/ml bis 4 mg/ml in Form von Boxplots mit Punktwolken dargestellt. Die grau gefärbten Boxplots mit schwarzer Punktwolke stellen den Plättchenmarker SDF-1 unter Aflibercept dar, die weiß gefüllten Boxplots mit weißer Punktwolke stellen den Plättchenmarker mit der Lösung ohne Wirkstoff dar. Zwischen Aflibercept und der Kontrolllösung konnte in keiner der fünf untersuchten Konzentrationen eine signifikant veränderte Expression von SDF-1 festgestellt werden. Alle dargestellten Daten beziehen sich auf den Vergleich mit der Negativkontrolle, ruhende Thrombozyten nach Inkubation mit PBS.

Einfluss von Rituximab

Es wurden Experimente mit 4 mg/ml Rituximab und 0,04 µg/ml Rituximab durchgeführt und die Expression der Plättchenmarker GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 gemessen. Im Vergleich zu PBS zeigten alle Plättchenmarker einen signifikanten Unterschied nach Inkubation mit Rituximab in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Lediglich SDF-1 zeigte keine signifikante Veränderung nach Inkubation mit 4 mg/ml Rituximab.

GP IIb/IIIa wurde im Vergleich mit PBS unter 4 mg/ml Rituximab signifikant vermindert (95 %-KI: 0,271-0,362; $P < 0,05$) und nach 0,04 µg/ml Rituximab signifikant erhöht gemessen (95 %-KI: 1,479-1,921; $P < 0,05$) (siehe Abb. 8a).

CD62P war im Vergleich mit PBS unter 4 mg/ml und 0,04 µg/ml Rituximab signifikant verstärkt exprimiert (95 %-KI: 1,263-2,137; $P < 0,05$ und 95 %-KI: 1,586-2,557; $P < 0,05$) (siehe Abb. 8b).

SDF-1 wurde im Vergleich mit PBS unter 0,04 µg/ml Rituximab signifikant verstärkt gemessen (95 %-KI: 1,515-2,714; $P < 0,05$). Unter Rituximab 4 mg/ml konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (95 %-KI: 0,595-1,205) (siehe Abb. 8c).

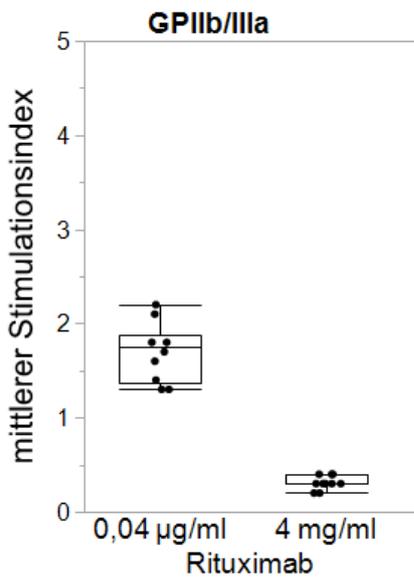


Abb. 8a

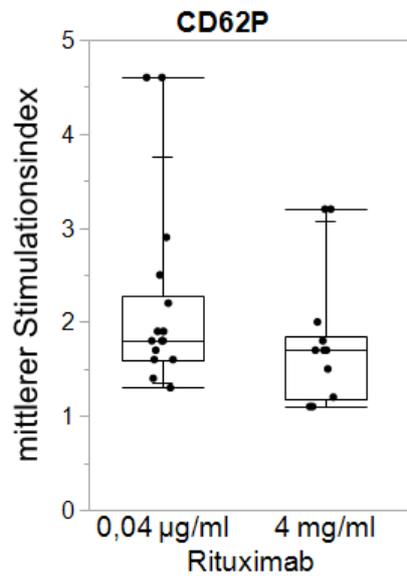


Abb. 8b

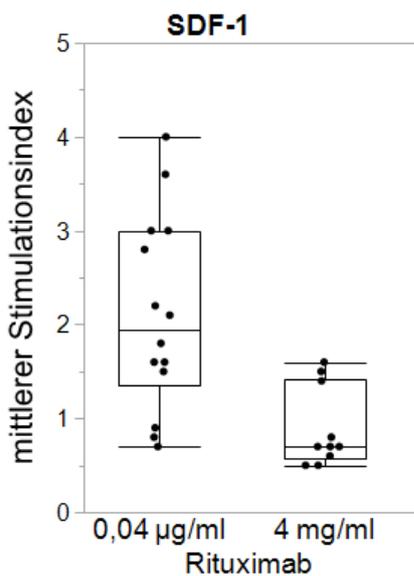


Abb. 8c

Abb. 8a-c: GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 unter Einfluss von Rituximab

Die gemessenen Daten der drei Plättchenmarker GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 bei ruhenden Thrombozyten sind hier für die untersuchten Konzentrationen 0,04 µg/ml und 4 mg/ml Rituximab in Form von Boxplots mit Punktwolken der einzelnen Messwerte dargestellt. Fast alle Plättchenmarker waren im Vergleich zu PBS (95 %-KI: 1,0-1,0) signifikant hochreguliert, mit Ausnahmen von GP IIb/IIIa nach Inkubation mit 4 mg/ml Rituximab, hier zeigte sich eine signifikant verminderte Expression ($P < 0,05$). Bei SDF-1 nach Inkubation mit 4 mg/ml Rituximab konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Bei den Abbildungen wird jeweils PBS als Referenz des mittleren Stimulationsindex betrachtet. Die dargestellten Daten beziehen sich auf den Vergleich mit der Negativkontrolle, ruhende Thrombozyten mit PBS.

3.2 Experimente mit Aktivierung der Thrombozyten

Einfluss von Aflibercept oder seiner Lösung vor Aktivierung von Thrombozyten

Es wurden Experimente mit Aflibercept bzw. dem alleinigen Lösungsmittel in den fünf Konzentrationen 4 mg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml und 0,04 µg/ml durchgeführt. Es fanden Untersuchungen mit 10 min und 30 min Inkubationszeit statt. Zur Aktivierung der Thrombozyten wurden die Agonisten Thrombin und PAR-4-AP verwendet. Gemessen wurde die Expression der Plättchenmarker GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1.

Thrombin als Agonist

GP IIb/IIIa wurde unter dem Einfluss von 4 µg/ml Aflibercept im Vergleich mit der Lösung nach einer Präinkubation von 30 min (95 %-KI: 2,646-4,482 vs. 95 %-KI: 1,788-2,412; $P < 0,05$) und bei 400 µg/ml und 4 mg/ml nach einer Präinkubation von 10 min (400 µg/ml: 95 %-KI: 1,074-2,104 vs. 95 %-KI: 0,611-1,411; $P < 0,05$ und 4 mg/ml: 95 %-KI: 0,914-2,566 vs. 95 %-KI: 0,481-1,599; $P < 0,05$) signifikant verstärkt gemessen. Es zeigte sich keine signifikant veränderte Expression von GP IIb/IIIa im Vergleich von Aflibercept mit der Lösung in den anderen untersuchten Konzentrationen.

Im Vergleich der beiden Inkubationszeiten konnten keine signifikanten Veränderungen für alle untersuchten Konzentrationen festgestellt werden. Ausnahme war eine signifikant verstärkte Expression von GP IIb/IIIa nach einer Inkubationszeit von 30 min im Vergleich zu 10 min unter Aflibercept 40 µg/ml

($P < 0,05$) und $0,04 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) und unter der Lösung $40 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$) und $0,04 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$).

Thrombin-aktivierte Thrombozyten nach Inkubation mit Aflibercept oder seiner Lösung zeigten folgende signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Thrombin-aktivierten Thrombozyten mit PBS: Die Expression von GP IIb/IIIa war bei 4 mg/ml der Lösung mit 10 min und 30 min Präinkubation vermindert (beide $P < 0,05$) und bei $4 \mu\text{g/ml}$ Aflibercept mit 30 min Präinkubation verstärkt ($P < 0,05$). Bei $0,04 \mu\text{g/ml}$ Aflibercept und seiner Lösung wurde eine signifikante Verstärkung mit beiden Präinkubationszeiten gemessen ($P < 0,05$). Es gab keine weiteren signifikanten Veränderungen im Vergleich mit aktivierten Thrombozyten mit PBS.

Bei der Messung von CD62P gab es keine signifikanten Veränderungen im Vergleich von Aflibercept mit dem Lösungsmittel in allen Konzentrationen mit beiden Präinkubationszeiten. Ausnahme war eine signifikant verstärkte Expression unter $0,04 \mu\text{g/ml}$ Aflibercept nach 10 min Präinkubation im Vergleich mit der Lösung (95 %-KI: 1,184-1,801 vs. 95 %-KI: 1,069-1,546; $P < 0,05$).

Auch im Vergleich von 10 min Inkubationszeit mit 30 min Inkubationszeit wurden keine signifikanten Veränderungen für die Ausprägung von CD62P festgestellt. CD62P wurde im Vergleich von Thrombin-aktivierten Thrombozyten mit PBS und Thrombin-aktivierten Thrombozyten unter Aflibercept $400 \mu\text{g/ml}$ und $40 \mu\text{g/ml}$ nach 10 und 30 min, sowie unter Aflibercept $4 \mu\text{g/ml}$ nach 10 min und $0,04 \mu\text{g/ml}$ nach 30 min signifikant verstärkt gemessen ($P < 0,05$). Bezüglich der Lösung konnte bei $4 \mu\text{g/ml}$ nach 10 und 30 min Präinkubation, als auch bei $40 \mu\text{g/ml}$ und $0,04 \mu\text{g/ml}$ nach 30 min eine verstärkte Expression von CD62P nach Aktivierung durch Thrombin gemessen werden ($P < 0,05$). Es gab keine weiteren signifikanten Veränderungen im Vergleich mit aktivierten Thrombozyten mit PBS.

Die Expression von SDF-1 zeigte keine signifikanten Veränderungen im Vergleich von Aflibercept mit der Kontrolle in allen Konzentrationen mit beiden Präinkubationszeiten. Ausnahme war eine signifikante Hochregulierung unter

4 mg/ml Aflibercept nach 30 min Präinkubation im Vergleich mit der Lösung (95 %-KI: 0,897-2,158 vs. 95 %-KI: 0,701-1,408; $P < 0,05$).

Beim Vergleich der Inkubationszeiten wurde SDF-1 signifikant verstärkt unter 4 mg/ml Aflibercept nach 30 min gemessen (95 %-KI: 0,884-1,516 vs. 95 %-KI: 1,206-2,737; $P < 0,05$) und signifikant vermindert unter 4 µg/ml Lösung nach 30 min (95 %-KI: 1,249-2,515 vs. 95 %-KI: 0,968-1,523; $P < 0,05$).

SDF-1 wurde im Vergleich von Thrombin-aktivierten Thrombozyten mit PBS und Thrombin-aktivierten Thrombozyten unter Aflibercept 4 mg/ml nach 10 min und unter Aflibercept 400 µg/ml nach 10 und 30 min Präinkubation signifikant vermindert gemessen ($P < 0,05$). Ebenso wurde SDF-1 bei diesem Vergleich unter Einfluss der Lösung 4 mg/ml unter beiden Präinkubationszeiten, sowie unter 400 µg/ml und 0,04 µg/ml nach 10 min und 4 µg/ml nach 30 min signifikant vermindert gemessen ($P < 0,05$).

PAR-4-AP als Agonist

GP IIb/IIIa war signifikant hochreguliert unter Aflibercept in den Konzentrationen 4 mg/ml, 400 µg/ml (siehe Abb. 9 und Abb. 10) und 4 µg/ml bei beiden Präinkubationszeiten ($P < 0,05$) und signifikant herabreguliert bei 40 µg/ml mit 10 min Präinkubation (95 %-KI: 2,653-3,947 vs. 95 %-KI: 3,455-5,400; $P < 0,05$) im Vergleich zum Lösungsmittel.

Im Vergleich der Präinkubationszeiten wurde sowohl unter Aflibercept als auch der Lösung in allen Konzentrationen außer 4 mg/ml eine signifikant verstärkte Expression von GP IIb/IIIa nach 30 min gemessen ($P < 0,05$).

Im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS war GP IIb/IIIa unter Aflibercept und der Lösung in der höchsten Konzentration signifikant vermindert (Aflibercept: $P < 0,05$, Lösungsmittel: $P < 0,05$), bei allen anderen Konzentrationen signifikant verstärkt exprimiert (Aflibercept: $P < 0,05$, Lösung: $P < 0,05$).

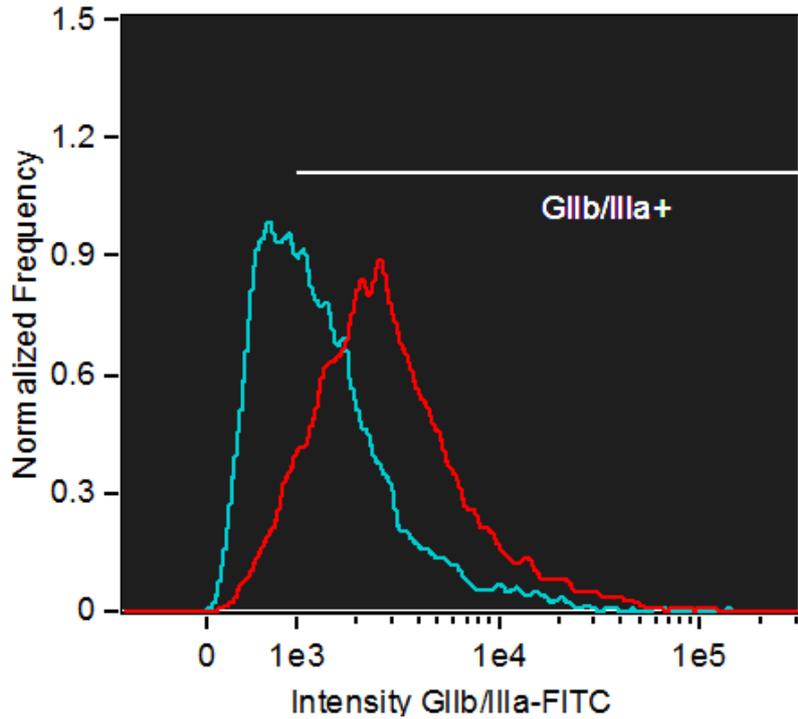


Abb. 9: Die Ausprägung von GP IIb/IIIa bei mit PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten unter 400 µg/ml Aflibercept (rot) und seiner Lösung (blau) im Vergleich (Sobolewska et al., 2018)

Die gemessene Intensität von GP IIb/IIIa auf der horizontalen Achse (Intensity GIIb/IIIa-FITC) ist gegen die Häufigkeit (Normalized Frequency) auf der vertikalen Achse aufgetragen. Die rote Linie stellt die mit PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten nach Inkubation mit 400 µg/ml Aflibercept dar, die blaue Linie die aktivierten Thrombozyten nach Inkubation mit 400 µg/ml der Kontrolllösung. Es ist deutlich zu sehen, dass Aflibercept eine stärkere Expression von GP IIb/IIIa bewirkt.

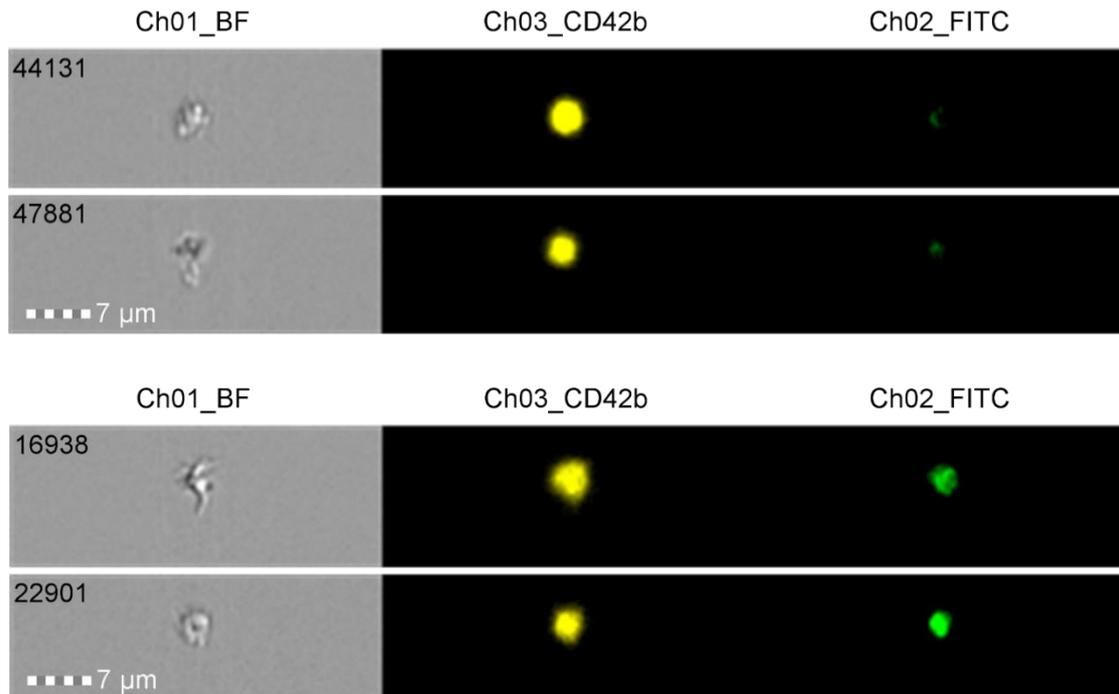


Abb. 10: Mit PAR-4-AP aktivierte Thrombozyten mit 400 µg/ml Afibercept (unten) und der Formulierung ohne Wirkstoff (oben) im Vergleich

Beispielhaft einzelne mit PAR-4-AP aktivierte Thrombozyten mit 400 µg/ml des Lösungsmittels in den oberen beiden Reihen und Afibercept in den unteren beiden Reihen. Die Zellen sind von links nach rechts im Hellfeld, mit gelber Fluoreszenz nach PE-Markierung und grüner Fluoreszenz nach GP IIb/IIIa-FITC-Markierung dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die grüne Fluoreszenz unter Afibercept im Vergleich zur Kontrolllösung stärker ausgeprägt ist, somit eine stärkere Ausprägung von GP IIb/IIIa vorliegt.

Der Oberflächenmarker CD62P zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Afibercept und der Kontrolllösung, außer einer signifikanten Hochregulation unter 0,04 µg/ml Lösung nach 30 min im Vergleich zu Afibercept (95 %-KI: 2,206-4,128 vs. 95 %-KI: 1,593-1,957; $P < 0,05$).

Im Vergleich der Präinkubationszeiten wurde eine signifikant verstärkte Expression von CD62P unter Afibercept nach 30 min bei 40 µg/ml und 0,04 µg/ml festgestellt ($P \leq 0,05$) und mit der Lösung nach 30 min bei 400 µg/ml, 40 µg/ml und 0,04 µg/ml ($P \leq 0,01$).

Im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS war CD62P unter Afibercept 400 µg/ml und 4 µg/ml nach beiden Präinkubationszeiten und unter Afibercept 40 µg/ml und 0,04 µg/ml nach 30 min verstärkt zu messen ($P \leq 0,05$). Bei der

Lösung war in den Konzentrationen von 0,04 µg/ml bis 400 µg/ml nach 30 min und bei 4 µg/ml nach 10 min eine verstärkte Expression von CD62P ersichtlich ($P \leq 0,05$).

SDF-1 zeigte keine signifikanten Veränderungen, außer einer Hochregulierung bei der Lösung 4 mg/ml nach 10 min und 0,04 µg/ml nach 30 min ($P < 0,05$) und einer Hochregulierung unter 4 µg/ml Aflibercept nach 30 min ($P < 0,05$).

Im Vergleich der Präinkubationszeiten war bei Aflibercept 400 µg/ml eine Zunahme der Expression von SDF-1 nach 30 min (95 %-KI: 0,880-1,365 vs. 95 %-KI: 1,138-2,306; $P < 0,05$), bei der Kontrolllösung 4 mg/ml und 4 µg/ml eine Abnahme nach 30 min zu vermerken ($P < 0,05$).

Im Vergleich mit aktivierten Thrombozyten mit PBS war SDF-1 unter Einfluss der Lösungsformulierung 4 mg/ml und 4 µg/ml nach 10 min und 0,04 µg/ml nach 30 min verstärkt zu messen ($P < 0,05$) und unter Aflibercept 4 µg/ml nach 30 min (95 %-KI: 0,985-1,677 vs. 95 %-KI: 1,772-3,290; $P < 0,05$).

Einfluss von Rituximab vor Aktivierung von Thrombozyten

Es wurde die Expression der drei Plättchenmarker GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 untersucht, nachdem die Plättchen 10 min mit Rituximab in 4 mg/ml und 0,04 µg/ml inkubiert wurden und anschließend mit den Agonisten Thrombin, TRAP und PAR-4-AP aktiviert wurden.

GP IIb/IIIa und SDF-1 waren signifikant vermindert exprimiert bei Thrombin-, TRAP-, PAR-4-AP-aktivierten Thrombozyten unter Rituximab 4 mg/ml im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten ohne Rituximab ($P < 0,05$).

CD62P wurde nicht signifikant verändert gemessen, Ausnahme war eine signifikant verminderte Expression bei Thrombin-aktivierten Thrombozyten unter 4 mg/ml Rituximab im Vergleich zu Thrombin-aktivierten Thrombozyten ohne Rituximab (95 %-KI: 1,297-1,948 vs. 95 %-KI: 1,849-3,084; $P < 0,05$).

GP IIb/IIIa war signifikant verstärkt ausgeprägt bei mit Thrombin und PAR-4-AP aktivierten Plättchen unter 0,04 µg/ml Rituximab im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten ohne Rituximab (Thrombin: 95 %-KI: 2,279-3,398 vs. 95 %-KI: 1,526-2,013; $P < 0,05$, PAR-4-AP: 95 %-KI: 2,090-4,835 vs. 95 %-KI: 1,686-

2,264; $P < 0,05$). GP IIb/IIIa war bei TRAP-aktivierten Plättchen unter Rituximab 0,04 µg/ml nicht signifikant verändert.

CD62P zeigte keine signifikanten Unterschiede außer einer verstärkten Ausprägung bei TRAP-aktivierten Plättchen unter Rituximab im Vergleich zu aktivierten Plättchen ohne Rituximab (95 %-KI: 11,546-19,726 vs. 95 %-KI: 9,919-17,226; $P < 0,05$).

Kein signifikanter Unterschied von SDF-1 fand sich nach Exposition von 0,04 µg/ml Rituximab.

Messung von Aflibercept-FITC nach Aktivierung der Thrombozyten

Untersucht wurden mit Thrombin, TRAP und PAR-4-AP aktivierte Thrombozyten, welche anschließend mit Aflibercept-FITC in den fünf Konzentrationen 1 mg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml und 0,04 µg/ml versetzt wurden.

Ein verstärktes Auftreten von Aflibercept-FITC auf der Thrombozyten-Oberfläche konnte in allen untersuchten Konzentrationen bei mittels Thrombin, TRAP und PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten im Vergleich zu PBS (MW: 1,00, KI: 1,0-1,0) gemessen werden. Die Steigerung war mit zwei Ausnahmen - bei einer Konzentration von 40 µg/ml Aflibercept-FITC unter PAR-4-AP- und Thrombin-aktivierten Thrombozyten - immer signifikant. Unter Stimulation mit TRAP und Thrombin ging eine kleinere Konzentration von Aflibercept-FITC mit einer stets verringerten Messung von Aflibercept-FITC einher (siehe Abb. 11).

Bei einer Konzentration von 1 mg/ml Aflibercept-FITC wurden unter Stimulation durch PAR-4-AP (95 %-KI: 1,625-2,508; $P < 0,05$), TRAP (95 %-KI: 1,801-3,624; $P < 0,05$) oder Thrombin (95 %-KI: 1,156-2,644; $P < 0,05$) signifikant erhöhte Werte von Aflibercept-FITC gemessen (siehe Abb. 12 und Abb. 13).

Auch bei einer Konzentration von 400 µg/ml waren mit Stimulation durch die Agonisten PAR-4-AP (95 %-KI: 1,286-3,114; $P < 0,05$), TRAP (95 %-KI: 1,598-2,527; $P < 0,05$) und Thrombin (95 %-KI 1,174-2,582; $P < 0,05$) signifikant erhöhte Werte von Aflibercept-FITC zu verzeichnen.

Aflibercept-FITC wurde auch in der Konzentration von 40 µg/ml bei TRAP-stimulierten Thrombozyten signifikant erhöht gemessen (95 %-KI: 1,177-2,137; $P < 0,05$), unter PAR-4-AP (95 %-KI: 0,938-1,685) und Thrombin (95 %-KI:

0,938-2,137) waren ebenfalls erhöhte Werte jedoch ohne Signifikanz festzustellen.

Bei einer Konzentration von 4 µg/ml Aflibercept-FITC waren mit Stimulation der Thrombozyten durch alle Agonisten signifikant erhöhte Werte von Aflibercept-FITC zu verzeichnen (PAR-4-AP: 95 %-KI: 1,298-1,791; P < 0,05; TRAP: 95 %-KI: 1,106-1,994; P < 0,05; Thrombin: 95 %-KI: 1,307-1,760; P < 0,05).

Für Aflibercept-FITC 0,04 µg/ml zeigten sich ebenfalls signifikant erhöhte Werte von Aflibercept-FITC unter Stimulation durch alle Agonisten (PAR-4-AP: 95 %-KI: 1,3-1,3; P < 0,05; TRAP: 95 %-KI: 1,168-1,382; P < 0,05; Thrombin: 95 %-KI: 1,090-1,481; P < 0,05).

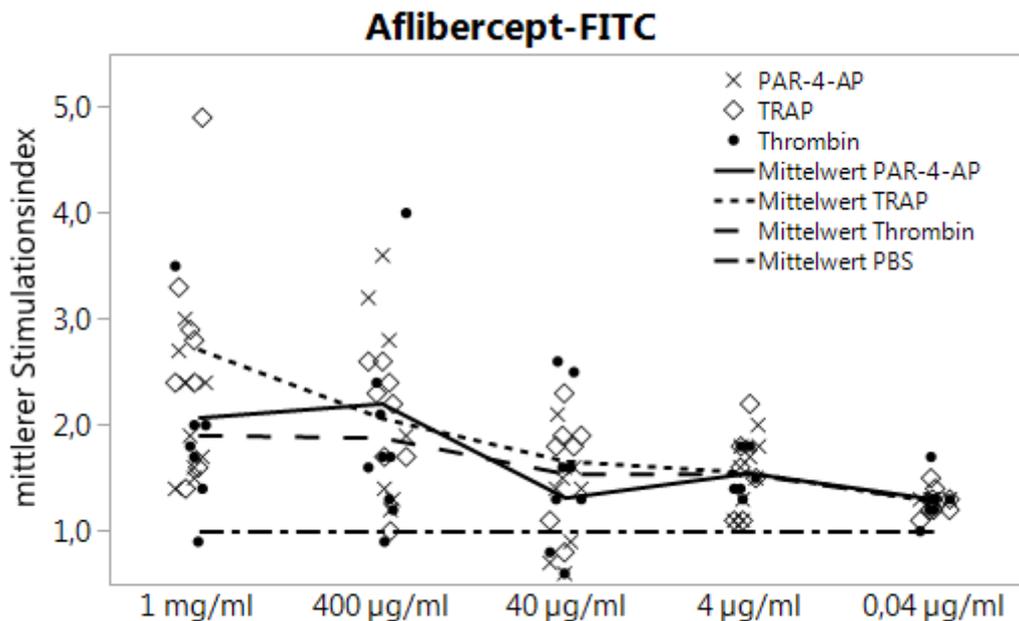


Abb. 11: Aktivierte Thrombozyten mit Aflibercept-FITC in den Konzentrationen 1 mg/ml bis 0,04 µg/ml versetzt im Vergleich

Die gemessenen Daten von mit Aflibercept-FITC versehenen Thrombozyten, wobei Aflibercept-FITC in den Konzentrationen von 1 mg/ml bis 0,04 µg/ml absteigend im Diagramm aufgeführt ist und die einzelnen Werte als Punkte dargestellt sind (PAR-4-AP als Kreuze, TRAP als helle Rauten, Thrombin als schwarze Punkte). Die Linien (PAR-4-AP als durchgezogene Linie, TRAP als kurz gestrichelte Linie und Thrombin als lang gestrichelte Linie) stellen die verbundenen Mittelwerte der genannten Gruppen dar. Alle Daten sind im Vergleich zur Negativkontrolle, Thrombozyten mit PBS (unregelmäßig gestrichelte Linie) dargestellt.

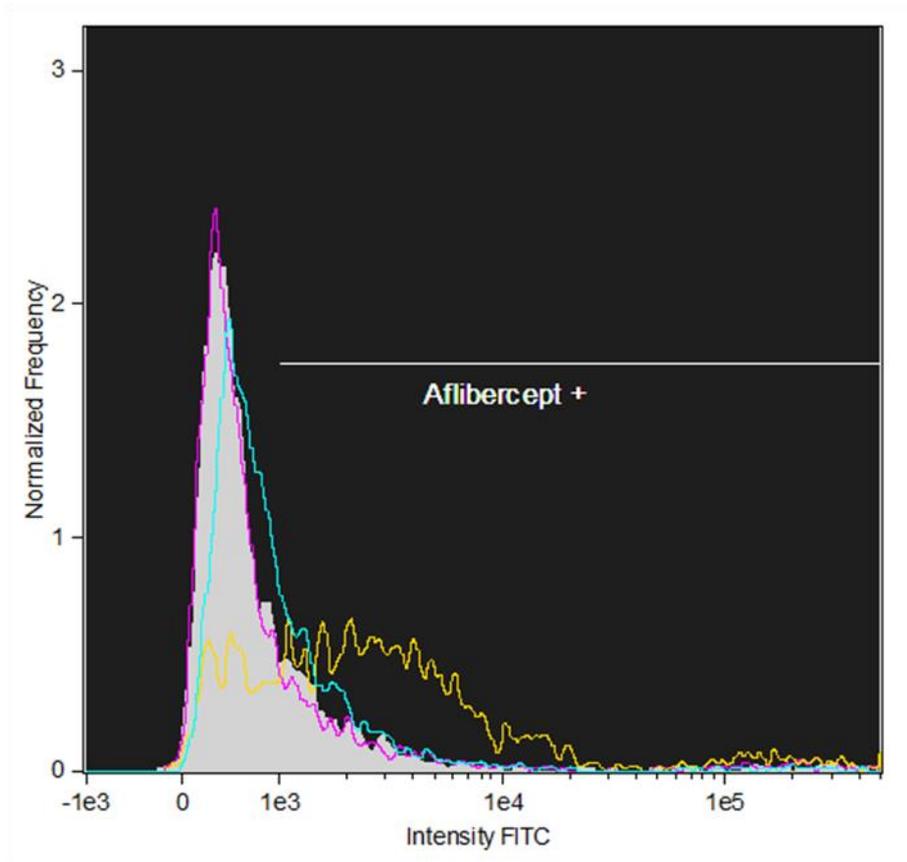


Abb. 12: Mit verschiedenen Agonisten aktivierte Thrombozyten mit 1 mg/ml Afibercept-FITC versetzt im Vergleich zueinander (Sobolewska et al., 2018)

Die Abbildung stellt die im ImageStream gemessene FITC-Intensität von aktivierten und mit 1 mg/ml Afibercept-FITC versehenen Thrombozyten dar. Die horizontale Achse entspricht der FITC-Intensität (Intensity FITC), die vertikale Achse der Häufigkeit (Normalized Frequency). Es sind die mit Thrombin (blaue Linie), PAR-4-AP (pinke Linie) und TRAP (gelbe Linie) aktivierten Thrombozyten dargestellt, als auch die nicht aktivierten Thrombozyten (grau).

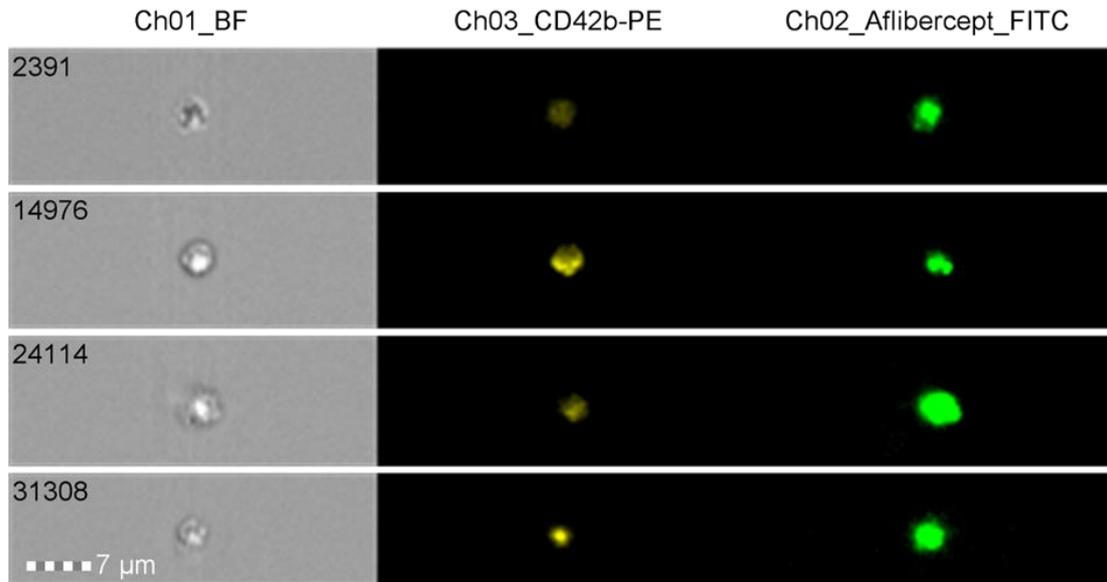


Abb. 13: Aktivierte Thrombozyten mit 1 mg/ml Aflibercept-FITC versetzt (Sobolewska et al., 2018)

Hier sind beispielhaft einzelne Thrombozyten zu sehen, welche mit 1 mg/ml Aflibercept-FITC versehen wurden. Links im Hellfeld, mittig mit PE markiert und gelb fluoreszierend, rechts mit Aflibercept-FITC markiert und grün fluoreszierend. Von oben nach unten sind dargestellt: nicht aktivierte Thrombozyten, mit Thrombin, TRAP und PAR-4-AP aktivierte Thrombozyten.

Einige wenige signifikante Unterschiede sind bei Aktivierung durch den gleichen Agonisten beim Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen von Aflibercept-FITC aufgetreten:

Unter Stimulation durch PAR-4-AP kam es zu einer signifikanten Verringerung zwischen den Aflibercept-FITC-Konzentrationen 1 mg/ml und 40 μ g/ml, 1 mg/ml und 4 μ g/ml und 1 mg/ml und 0,04 μ g/ml. Unter Stimulation mit TRAP kam es zu signifikant geringeren Messungen zwischen den Aflibercept-FITC-Konzentrationen 1 mg/ml und 4 μ g/ml, 1 mg/ml und 0,04 μ g/ml und 400 μ g/ml und 0,04 μ g/ml. Unter der Stimulation mit Thrombin kam es lediglich bei dem Vergleich von 4 μ g/ml mit 0,04 μ g/ml Aflibercept-FITC zu einer signifikanten Verringerung.

4 Diskussion

4.1 Hauptbeobachtungen

Aflibercept beeinflusste in dem hier beschriebenen experimentellen Ansatz die Aktivierung bzw. die Oberflächenmarker der Thrombozyten gesunder Probanden. Insgesamt ließen sich die beschriebenen teils signifikanten Veränderungen jedoch keinem einheitlichen Muster zuordnen.

Es fiel auf, dass vor allem GP IIb/IIIa bei mit PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten unter Einfluss von Aflibercept in den Konzentrationen von 0,04 µg/ml bis 400 µg/ml signifikant erhöht wurde. Auch im Vergleich zum untersuchten Lösungsmittel ohne Wirkstoff konnte für GP IIb/IIIa unter dem Einfluss der Aflibercept-Konzentrationen 4 mg/ml, 400 µg/ml und 4 µg/ml signifikant höhere Werte gemessen werden. In den Experimenten mit ruhenden Thrombozyten konnten entsprechende Veränderungen aber nicht beobachtet werden.

CD62P zeigte keine Ausschläge bei ruhenden Thrombozyten: Die Zunahme der Expression unter Aflibercept in den Konzentrationen 0,04 µg/ml bis 400 µg/ml unterschied sich nicht gegenüber der Kontrolllösung. Auch bei mittels Thrombin und PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten konnten in den Konzentrationen 0,04 µg/ml bis 400 µg/ml mehrfach signifikante Steigerungen unter Aflibercept verzeichnet werden. Weil diese Veränderungen jedoch auch mit dem Lösungsmittel beobachtet wurden, handelt es sich vermutlich um keinen spezifischen Effekt des Wirkstoffs.

Die Ausprägung des Plättchenmarkers SDF-1 lässt kein regelmäßiges oder konsistentes Muster erkennen, weder bei ruhenden Thrombozyten, noch bei Thrombozyten nach Aktivierung.

Des Weiteren ist bemerkenswert, dass bei aktivierten Thrombozyten fast ausschließlich signifikant erhöhte Mengen an freigesetztem Aflibercept-FITC an der Thrombozyten-Oberfläche zu messen waren, unabhängig der angewandten Konzentration oder des eingesetzten Agonisten.

Sowohl die gesteigerte Freisetzung von Aflibercept-FITC als auch die verstärkte Expression von GP IIb/IIIa bei durch PAR-4-AP aktivierten Plättchen müssen berücksichtigt werden, wenn ein möglicher Einfluss auf die Entstehung von ATEs

diskutiert wird. Bisher konnte weder ein sicherer Pathomechanismus für das Auftreten von ATEs z. B. der Tumorpatienten erklärt werden noch eine mögliche Interaktion mit anderen Risikofaktoren ausgeschlossen werden. Bereits in den Zulassungsstudien für Aflibercept fiel eine numerisch erhöhte Anzahl zerebrovaskulärer Ereignisse unter Aflibercept auf (Beaumont et al., 2014). Diese traten auch signifikant früher auf als in der Ranibizumab-Gruppe. Allerdings ist ein kausaler Zusammenhang zwischen Aflibercept und ATEs damit sicher nicht bestätigt. In einer Metaanalyse von Avery. et al. wurde ein signifikant gesteigertes Risiko für zerebrovaskuläre Ereignisse und vaskulär bedingten Tod bei monatlicher Injektion von Aflibercept und Ranibizumab zur Therapie des diabetesbedingten Makulaödems auffällig (Avery and Gordon, 2016). Eine Untersuchung an mehreren hundert Patienten hatte für den Therapiebeginn mit Bevacizumab innerhalb drei Monate nach einem zerebralen Ereignis eine erhöhte Mortalität festgestellt (Hanhart et al., 2018). Beim Versuch, die Entstehung der ATEs unter Therapie mit VEGF-Inhibitoren zu verstehen, sollten die strukturellen Unterschiede und Gemeinsamkeiten der VEGF-Inhibitoren mit bedacht werden, sodass deren Interaktion mit Thrombozyten und anderen Zellen besser verstanden werden kann.

4.2 Ruhende, nicht aktivierte Thrombozyten

Aflibercept zeigte bei dem Experiment mit ruhenden Thrombozyten nur mit der Konzentration von 4 mg/ml eine signifikante Aktivierung im Vergleich zur Kontrolllösung, wenn man den Marker GP IIb/IIIa betrachtet. Jedoch war die Expression des Markers bei diesem Experiment sowohl unter Einfluss von Aflibercept als auch der Lösung im Vergleich zu PBS signifikant vermindert. Dadurch verliert die verstärkte Ausprägung von GP IIb/IIIa unter Aflibercept im Vergleich zur Kontrolllösung in diesem Experiment an Aussagekraft. Des Weiteren war GP IIb/IIIa in keinem Experiment mit den anderen vier Konzentrationen im Vergleich von Aflibercept mit der Lösung signifikant verändert. Dies gilt auch für die beiden anderen Plättchenmarker CD62P und SDF-1. Abschließend kann angenommen werden, dass kein eindeutiger Einfluss von Aflibercept bzw. der Lösung auf nicht aktivierte Thrombozyten besteht.

Diese Annahme wird bestärkt durch eine andere *in vitro* Studie, welche humane Thrombozyten unter Zugabe von Heparin und Aflibercept-VEGF-Komplexen untersuchte (MacDonald et al., 2016). Auch in dieser Studie konnte keine Aktivierung der Thrombozyten festgestellt werden.

4.3 Aktivierte Thrombozyten

Das als IgG-Kontrolle eingesetzte Rituximab zeigte im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS sowohl signifikant erhöhte als auch verminderte Oberflächenmarker. Jedoch war bei diesem Experiment auffällig, dass die unter Rituximab 4 mg/ml gehäuft auftretenden signifikanten Veränderungen durchweg aus einer verminderten Ausprägung der Oberflächenmarker bestand.

Diese Auffälligkeit scheint unabhängig von dem Agonisten, welcher zur Aktivierung der Thrombozyten eingesetzt wurde. Mögliche Erklärungen könnten die chemische Beschaffenheit von Rituximab sein: Es ist bekannt, dass ein saures Milieu die Fähigkeit der Plättchen zur Aggregation stark beeinflusst (Green et al., 1978). Bei einem pH von 7,4 findet die Aggregation nur noch zu 77 % statt, bei einem pH von 6,8 nur noch zu 24 %, wobei die inhibierte Funktion der Plättchen bis zu einem pH von > 5,5 % reversibel ist. Mit einem pH von 6,29 für unverdünntes Rituximab der Konzentration 10 mg/ml könnte eine geringfügige unspezifische Inhibition der Thrombozyten die Ergebnisse erklären. Dieser Aspekt betrifft auch teilweise die Experimente mit Aflibercept, welches unverdünnt mit 40 mg/ml einen pH von 6,05 besitzt (Sobolewska et al., 2017) und dementsprechend auch das Lösungsmittel ohne Wirkstoff, welches bei der Herstellung für unsere Experimente auf einen pH von 6,2 eingestellt wurde. Allerdings muss auch an off-target Effekte für Rituximab gedacht werden.

Bei den Experimenten mit PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten konnten durchaus für jeden Oberflächenmarker signifikante Veränderungen festgestellt werden. Für SDF-1 waren diese Veränderungen jedoch relativ spärlich und es lässt sich daraus kein Muster ableiten. Eine auffällige Regelmäßigkeit trat vor allem bei dem Oberflächenmarker GP IIb/IIIa auf: In allen Konzentrationen außer der höchsten war dieser bei mit PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten mit Aflibercept im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS signifikant

verstärkt zu messen, was auf eine Aktivierung hinweist. Die Ausnahme, eine signifikante Verminderung in der Konzentration von 4 mg/ml kann, wie bereits oben geschildert, auf einen verminderten pH zurückgeführt werden (Green et al., 1978, Sobolewska et al., 2017). Für die Möglichkeit einer Aktivierung durch Aflibercept spricht die Beobachtung, dass GP IIb/IIIa bei Aflibercept im Vergleich zur Lösung in den drei höchsten Konzentrationen 4 mg/ml, 400 µg/ml und 40 µg/ml bei beiden Inkubationszeiten signifikant höher vorlag. Es ist jedoch fraglich, ob die Aktivierung der Thrombozyten durch Inkubation mit Aflibercept oder letztlich durch den Agonisten PAR-4-AP herbeigeführt wurde, da im Experiment mit der Lösung im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS auch signifikante Steigerungen von GP IIb/IIIa vorlagen. Gegen eine ausschließlich durch PAR-4-AP hervorgerufene Aktivierung sprach die Tatsache, dass im Vergleich der Inkubationszeiten mit Aflibercept bzw. der Kontrolllösung signifikante Steigerungen von GP IIb/IIIa in allen Konzentrationen (außer 4 mg/ml) vorlagen. Dementsprechend ist eine Aktivierung der Thrombozyten auf eine längere Inkubation mit Aflibercept bzw. der Lösung zurückzuführen. Die Ergebnisse des Oberflächenmarkers CD62P entsprachen den Veränderungen von GP IIb/IIIa: In der höchsten Konzentration waren keine signifikanten Veränderungen zu bemerken, möglicherweise durch den niedrigen pH inhibiert (Green et al., 1978, Sobolewska et al., 2017), in den anderen Konzentrationen sind lückenhaft signifikante Steigerungen im Vergleich der Inkubationszeiten und im Vergleich zu aktivierten Thrombozyten mit PBS zu vermerken. Eine Zunahme von CD62P nach Aflibercept wurde jedoch nicht beobachtet. Dementsprechend stellt sich die Frage, wie die erhöhten Werte von GP IIb/IIIa und die damit angenommene aktivierende Wirkung von Aflibercept erklärt werden können. Betrachtet man das als IgG-Kontrolle eingesetzte Rituximab, so war hier ebenfalls eine signifikant verstärkte Expression von GP IIb/IIIa bei der Konzentration 0,04 µg/ml bei Stimulation durch Thrombin und PAR-4-AP zu erkennen.

Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von GP IIb/IIIa wäre eine über den Fcγ-Rezeptor IIa (FcγRIIa) vermittelte *outside-in*-Aktivierung von GP IIb/IIIa, da der FcγRIIa in wesentlichem Maß an der *outside-in*-

Signalverstärkung beteiligt ist (Boylan et al., 2008). Der FcγR11a wird durch Stimulation der Plättchen aktiviert und dient als Rezeptor für IgG-Immunkomplexe. Er besteht aus zwei extrazellulären homologen Domänen, welche die Fc-Region der IgG binden können. Dadurch ist der FcγR11a zur Rezeptor-vermittelten Endozytose und der Aufnahme von IgGs aus dem Plasma in das α-Granula der Thrombozyten befähigt. *In vitro* und *in vivo* Studien belegen eine FcγR11a-vermittelte Verstärkung der GP IIb/IIIa-*outside-in*-Prozesse (Arman and Krauel, 2015). Folglich wäre denkbar, dass auch Aflibercept über seine Fc-Domäne mit dem FcγR11a aktivierter Thrombozyten interagiert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Immunkomplexe aus Bevacizumab und VEGF mit Heparin zu einer FcγR11a-abhängigen Aktivierung der Plättchen führen. Des Weiteren hat Meyer et al. in einer Studie an transgenen Mäusen mit FcγR11a nachgewiesen, dass Immunkomplexe aus Bevacizumab und VEGF unter Zugabe von Heparin durch Aktivierung des FcγR11a zu einer Plättchen-Aktivierung führen, was zur Aggregation und thrombotischen Ereignissen führte (Meyer et al., 2009). Dementsprechend wäre es also auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Bevacizumab und Aflibercept durchaus möglich, dass auch Aflibercept-VEGF-Komplexe mit der Fc-Region an den Rezeptor binden können und damit eine Aktivierung auslösen.

Im Gegensatz zu der in unseren Experimenten gesteigerten Expression des Oberflächenmarkers GPIIb/IIIa, konnte dies in vorherigen Studien weder bei der IgG-Kontrolle Bevacizumab, noch bei dem Fab-Fragment Ranibizumab beobachtet werden (Sobolewska et al., 2015).

Gegen die Aktivierung der Thrombozyten durch Aflibercept über den FcγR11a spricht eine Studie von Mac-Donald et al., welcher das unterschiedliche Bindungsverhalten von Aflibercept bzw. Bevacizumab an VEGF beleuchtet (MacDonald et al., 2016). Es wird beschrieben, dass Bevacizumab als kompletter Antikörper, bestehend aus zwei Fab-Fragmenten und einer Fc-Domäne, multimerische Komplexe mit VEGF formt, welche über den FcγR11a Plättchen aktivieren. Man könnte annehmen, dass Aflibercept, bestehend aus zwei VEGF-Bindungsdomänen an einer Fc-Domäne, sich ebenso verhält. Jedoch bildet Aflibercept mit VEGF homogene 1:1 Komplexe, welche weder eine erhöhte

Affinität zum Fc γ -Rezeptor aufzeigen noch zu einer Plättchen-Aktivierung führen (MacDonald et al., 2016).

An dieser Stelle sollten weitere Untersuchungen beleuchtet werden, welche sich mit dem strukturellen Aufbau der VEGF-Inhibitoren befasst haben: *In vivo* Untersuchungen an Affen zeigten, dass Ranibizumab als Fab-Fragment die Retina durch interzelluläre Spalten durchdringt, während das Fc-Fusionsprotein Aflibercept in die retinale Zellen aufgenommen wird (Julien et al., 2014). Dies hatte sowohl pro- als auch antikoagulatorische Auswirkungen in Form von Blutungen und Blutstase zur Folge. Dies lässt mutmaßen, dass Aflibercept mittels seines Fc-Fragments mit anderen Zellen interagieren kann.

Weitere *in vitro* Untersuchungen an Rinderretina zeigten, dass der von retinalen Endothelzellen exprimierte Fc-Rezeptor für den intrazellulären Transport von Aflibercept von Bedeutung zu sein scheint: Es wurde beobachtet, dass Aflibercept in den Endothelzellen geringfügig akkumuliert (Deissler et al., 2014), wobei es temperaturabhängig aufgenommen wurde und sich anschließend in Endosomen befand, welche den Fc-Rezeptor besitzen (Deissler et al., 2017). Bei inaktiviertem Fc-Rezeptor konnte sowohl eine beeinträchtigte Aufnahme als auch ein verzögerter intrazellulärer Transport beobachtet werden, unter diesen Umständen wird ein intrazellulärer Abbau nach Aufnahme vermutet (Deißler et al., 2017).

Weitere *in vitro* Untersuchungen deuteten auf ein unterschiedliches Verhalten der VEGF-Inhibitoren auf zellulärer Ebene hin: An humanen retinalem Pigmentepithel konnte beobachtet werden, dass zwar Bevacizumab jedoch nicht Aflibercept für die intrazelluläre Aufnahme einen Fc-Rezeptor benötigte (Ranjbar et al., 2016). An Versuchen mit verschiedenen Zelllinien zeigten sich unter Aflibercept über 72 Stunden keine veränderte Zellmorphologie oder toxische Effekte, für Ranibizumab und Bevacizumab konnte mehr Einfluss auf die Zellphysiologie festgestellt werden (Schnichels et al., 2013). Auch wurde für Ranibizumab und Bevacizumab eine signifikant verminderte Zellproliferation festgestellt (Parisi et al., 2019). Eine andere *in vitro* Studie zeigte jedoch eine beeinträchtigte Wundheilung und Phagozytose der Epithelzellen nach intrazellulärer Aufnahme von Aflibercept (Klettner et al., 2014).

Es bleibt festzuhalten, dass die Fc-Region des Fusionsproteins Aflibercept von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint, was sein Verhalten auf zellulärer Ebene betrifft, es trotzdem deutliche Unterschiede im Vergleich zu dem strukturell ähnlichen Bevacizumab gibt.

Aflibercept-FITC war in allen Konzentrationen nach Stimulation unter allen Agonisten signifikant verstärkt zu messen, lediglich bei der Konzentration von 40 µg/ml war die Veränderung im Vergleich zu PBS nach Stimulation mit PAR-4-AP und Thrombin nicht signifikant, jedoch auch gesteigert. Daraus lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit schließen, dass die Aktivierung der Thrombozyten mit einem der drei genannten Agonisten zu einer verstärkten Freisetzung des Medikaments führte. Des Weiteren war ersichtlich, dass die Konzentration von Aflibercept-FITC mit der Intensität der von den Thrombozyten ausgehenden Fluoreszenz weitestgehend korrelierte. Folglich kann angenommen werden, dass eine konzentrationsabhängige Aufnahme von Aflibercept in die Thrombozyten stattfindet. Diese Annahmen decken sich mit den Ergebnissen vorheriger Experimente, bei denen die FITC-gekoppelten VEGF-Hemmer Bevacizumab und Ranibizumab zum Einsatz kamen (Sobolewska et al., 2015). Auch bei diesen Experimenten waren signifikant gesteigerte Fluoreszenzintensitäten bei mit Thrombin, TRAP und PAR-4-AP aktivierten Thrombozyten zu messen. Dies bestärkt die Annahme, dass es sowohl zu einer Internalisierung in die Thrombozyten als auch zu einer Freisetzung durch Aktivierung der Thrombozyten kommt.

Des Weiteren wurde bereits durch Experimente in vitro und in vivo (an Hasen) belegt, dass Bevacizumab in Thrombozyten aufgenommen wird und dort das im α -Granula gespeicherte VEGF inhibiert, wobei nach Aktivierung sowohl Bevacizumab als auch das an Bevacizumab gebundene VEGF freigesetzt wird (Verheul et al., 2007). Auffällig war bei dieser Studie außerdem, dass die Halbwertszeit des in die Plättchen aufgenommenen Bevacizumabs deutlich länger war als des im Plasma vorliegenden Bevacizumabs.

Da Aflibercept wie Bevacizumab ein vollständiges Immunglobulin ist, kann in Anbetracht der Ergebnisse dieses Experiments mit Aflibercept-FITC durchaus gemutmaßt werden, dass ein ähnliches Verhalten vorliegt. Dementsprechend

könnte die Internalisierung von Aflibercept auch Auswirkungen auf dessen Halbwertszeit haben und eine Aktivierung der Thrombozyten zu einer Konzentrationserhöhung von Aflibercept im Plasma führen. Auch wäre eine durch die Internalisierung veränderte Funktion der Plättchen denkbar. Die Experimente von Verheul et al. zeigten nach Bevacizumab-Aufnahme in die Plättchen eine beeinträchtigte Plättchen-induzierte Endothelzellproliferation (Verheul et al., 2007).

Des Weiteren wurde klinisch untersucht, dass es bei wiederholter intravitrealer Injektion zu einer systemischen Akkumulation von sowohl Bevacizumab als auch Aflibercept kommen kann, welche mit einer Reduktion des im Plasma frei vorliegenden VEGF korrelieren könnte (Avery et al., 2014, Avery et al., 2017). Eine solche Akkumulation im Plasma und in den Thrombozyten könnte durch die jahrelange Therapie erheblich zunehmen.

4.4 Limitationen

Für die Beurteilung der Ergebnisse müssen auch Aspekte und Grenzen des Studiendesigns beachtet werden. Die Experimente wurden zwar an humanen Thrombozyten durchgeführt, jedoch können die Ergebnisse unserer *in vitro* Studie nicht direkt auf Thrombozyten und deren Interaktionen im menschlichen Blutkreislauf übertragen werden.

Des Weiteren wurden Thrombozyten junger, gesunder Probanden verwendet. Deren Gesundheitszustand ist jedoch nicht mit dem der Risikogruppe der neovaskulären AMD gleichzusetzen. Es darf aber nicht vorausgesetzt werden, dass sich die Zellen unterschiedlichen Alters vollständig entsprechen.

Probanden wurden bzgl. der Einnahme relevanter Wirkstoffe befragt, die die Thrombozyten in ihrer Funktion beeinflussen könnten. Seltene individuelle Varianten mit Auswirkungen auf die Thrombozyten-Funktion können aber nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Mit mindestens drei Experimenten pro Versuchskonstellation sollten zwar Messabweichungen und die Streuung kontrolliert werden; es ist aber nicht gewährleistet, dass sich sämtliche Einflüsse auf die Thrombozyten in den Ergebnissen widerspiegeln.

Es bleibt zu erwähnen, dass die Thrombozyten verschiedene mechanische Verfahren wie die Blutentnahme, die Zentrifugation und das Pipettieren für die Herstellung der Proben durchlaufen mussten. Somit können eine teilweise Spontanaktivierung und sonstige Quellen für Messfehler nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die Herstellung der Proben fand jedoch in routinierten Handlungsabläufen statt und für jede Probe wurde eine Negativkontrolle hergestellt, um mögliche Einflussfaktoren auszuschließen.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann eine Interaktion von Aflibercept mit den Thrombozyten nicht ausgeschlossen werden. Die signifikante Hochregulation bei PAR-4-AP- und Thrombin-aktiviertem GP IIb/IIIa unter Aflibercept im Vergleich zum Lösungsmittel deutet auf eine mögliche Interaktion hin. Vor allem die signifikant verstärkte Messung von Aflibercept-FITC aus aktivierten Thrombozyten sprach dafür, dass Aflibercept von den Thrombozyten internalisiert und freigesetzt wird. Die Aufnahme von Bevacizumab in Blutplättchen kann eine inhibierte Endothelzellproliferation zur Folge haben und/oder sich auf die Funktion der Plättchen auswirken (Verheul et al., 2007). Sollte sich Aflibercept nach einer Aufnahme in die Thrombozyten ähnlich verhalten wie Bevacizumab, könnten entsprechende Phänomene unter der Therapie mit Aflibercept nicht ausgeschlossen werden.

Die Therapie der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration besteht aus wiederholten intravitrealen Injektionen von VEGF-Hemmern. Da es sich um keine kurative Behandlung einer chronischen Erkrankung handelt, ist die Notwendigkeit zur Dauertherapie sehr häufig gegeben. Somit sollte berücksichtigt werden, dass es - sowohl im Kreislauf als auch in den Thrombozyten - zu einer Akkumulation von Aflibercept kommen kann. Dies wiederum würde möglicherweise bei einer Aktivierung der Thrombozyten zu einer erheblichen Freisetzung von Aflibercept bei gleichzeitig stark verminderten VEGF-Konzentrationen führen. Diese pharmakokinetische Besonderheit kann von Bedeutung sein, wenn schwere Nebenwirkungen wie arterielle Thromboembolien relevant werden.

Deshalb sollten sich unbedingt langfristig angelegte Nachfolgestudien mit ausreichend großen Fallzahlen der Interaktion von Aflibercept mit Thrombozyten und dem Auftreten von ATEs widmen. Hierbei erscheint es sinnvoll, Risikogruppen klar zu definieren. Auch sollte der Prozess der Internalisierung weiterverfolgt und auf zellulärer Ebene an z. B. auch mit Endothelzellen der Netzhaut untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Aflibercept ist ein rekombinantes Fusionsprotein, das vergleichbar mit Bevacizumab und Ranibizumab in der Therapie der neovaskulären AMD verwendet wird. Nach anhaltender Diskussion und einer unzureichenden Datenlage über thrombo-embolische Ereignisse nach lokaler Applikation der VEGF-Inhibitoren, sollte diese experimentelle Arbeit einen möglichen Einfluss von Aflibercept auf die Aktivität von Thrombozyten untersuchen. Zu diesem Zweck wurden *in vitro* Proben mit menschlichen Thrombozyten extrahiert und mit verschiedenen Konzentrationen von Aflibercept bzw. dessen Lösung (4 mg/ml, 400 µg/ml, 40 µg/ml, 4 µg/ml und 0,04 µg/ml) inkubiert. Untersucht wurden Thrombozyten mit und ohne Agonisten wie Thrombin, TRAP und PAR-4-AP. Die drei verschiedenen thrombozytären Oberflächenproteine GP IIb/IIIa, CD62P und SDF-1 werden bei aktivierten Thrombozyten an der Oberfläche verstärkt präsentiert. Anhand dieser konnte mittels Durchflusszytometrie die Aktivierung der Thrombozyten beurteilt werden. Nicht-aktivierte Thrombozyten zeigten keine Veränderungen mit Aflibercept. CD62P als auch SDF-1 zeigten keine veränderte Expression. Allerdings wurde eine signifikante Hochregulation des PAR-4-AP- und Thrombin-aktivierten GP IIb/IIIa gefunden. Thrombin-aktiviertes GP IIb/IIIa war nach Exposition von 4 mg/ml, 400 µg/ml und 4 µg/ml Aflibercept signifikant erhöht, ebenso PAR-4-AP-aktiviertes GP IIb/IIIa in den gleichen Konzentrationen. Durch Markierung mit FITC konnte das Fusionsprotein Aflibercept nach Aktivierung mittels PAR-4-AP oder Thrombin in allen Konzentrationen außer 40 µg/ml im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht angetroffen werden. Die Resultate erhärten den Verdacht einer Internalisierung von Aflibercept in Thrombozyten und Freisetzung nach Aktivierung der Thrombozyten. Dadurch findet eine Interaktion zwischen Aflibercept und den Thrombozyten statt, die u.a. über verstärkte Aktivierung von GP IIb/IIIa die Blutgerinnung beeinflussen könnte. Weitere Experimente und klinische Studien sind unabdingbar, um einen Zusammenhang zwischen der Therapie mittels Aflibercept und unerwünschten Nebenwirkungen zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

- AHFAT, F. & ZAIDI, F. 2013. Bevacizumab vs ranibizumab—an appraisal of the evidence from CATT and IVAN. Nature Publishing Group.
- ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION 1994. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Bmj*, 308, 81-106.
- ARMAN, M. & KRAUEL, K. 2015. Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13, 893-908.
- AVERY, R. L., CASTELLARIN, A. A., STEINLE, N. C., DHOOT, D. S., PIERAMICI, D. J., SEE, R., COUVILLION, S., NASIR, M. A. A., RABENA, M. D., LE, K., MAIA, M. & VISICH, J. E. 2014. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *British Journal of Ophthalmology*, 98, 1636-1641.
- AVERY, R. L., CASTELLARIN, A. A., STEINLE, N. C., DHOOT, D. S., PIERAMICI, D. J., SEE, R., COUVILLION, S., NASIR, M. A. A., RABENA, M. D. & MAIA, M. 2017. Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab, and ranibizumab. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 37, 1847.
- AVERY, R. L. & GORDON, G. M. 2016. Systemic Safety of Prolonged Monthly Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for Diabetic Macular Edema: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA ophthalmology*, 134, 21-29.
- BARON, J. A., SANDLER, R. S., BRESALIER, R. S., LANAS, A., MORTON, D. G., RIDDELL, R., IVERSON, E. R. & DEMETS, D. L. 2008. Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *The Lancet*, 372, 1756-1764.
- BAYER PHARMA. 2012. *Fachinformation Eylea® 40 mg/ml* [Online]. Available: http://www.vistanet.de/img/EYLEA_Fachinformation.pdf [Accessed 30.10.2017].
- BEAUMONT, P. E., PETOCZ, P. & KANG, H. K. 2014. Is There Risk of Stroke with Aflibercept? *Ophthalmology*, 121, e4.
- BERG, K., PEDERSEN, T. R., SANDVIK, L. & BRAGADÓTTIR, R. 2015. Comparison of ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration according to LUCAS treat-and-extend protocol. *Ophthalmology*, 122, 146-152.
- BOURNE, R. R., JONAS, J. B., FLAXMAN, S. R., KEEFFE, J., LEASHER, J., NAIDOO, K., PARODI, M. B., PESUDOVS, K., PRICE, H. & WHITE, R. A. 2014. Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990–2010. *British Journal of Ophthalmology*, 98, 629-638.
- BOYLAN, B., GAO, C., RATHORE, V., GILL, J. C., NEWMAN, D. K. & NEWMAN, P. J. 2008. Identification of FcγRIIa as the ITAM-bearing

- receptor mediating $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ outside-in integrin signaling in human platelets. *Blood*, 112, 2780-2786.
- BRANDL, C., STARK, K. J., WINTERGERST, M., HEINEMANN, M., HEID, I. M. & FINGER, R. P. 2016. Epidemiologie der altersbedingten Makuladegeneration. *Der Ophthalmologe*, 113, 735-745.
- BROWN, D. M., MICHELS, M., KAISER, P. K., HEIER, J. S., SY, J. P. & IANCHULEV, T. 2009. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*, 116, 57-65. e5.
- BROWNING, D. J., KAISER, P. K., ROSENFELD, P. J. & STEWART, M. W. 2012. Aflibercept for Age-Related Macular Degeneration: A Game-Changer or Quiet Addition? *American Journal of Ophthalmology*, 154, 222-226.
- CAMPBELL, J. P., BRESSLER, S. B. & BRESSLER, N. M. 2012. Impact of Availability of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy on Visual Impairment and Blindness Due to Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Archives of ophthalmology*, 130, 794-795.
- CHAKRAVARTHY, U., HARDING, S. P., ROGERS, C. A., DOWNES, S. M., LOTERY, A. J., CULLIFORD, L. A., REEVES, B. C. & INVESTIGATORS, I. S. 2013. Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. *The Lancet*, 382, 1258-1267.
- CHATTERJEE, M. & GAWAZ, M. 2013. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11, 1954-1967.
- CHUNG, A. W. Y., JURASZ, P., HOLLENBERG, M. D. & RADOMSKI, M. W. 2002. Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *British Journal of Pharmacology*, 135, 1123-1132.
- COHEN, J. 1992. Statistical power analysis. *Current directions in psychological science*, 1, 98-101.
- DAME, C., GAEDICKE, G. & SCHULZE, H. 2006. Physiologie der Megakaryopoiese und des Thrombozyten. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 154, 502-509.
- DEIßLER, H., LANG, G. & LANG, G. 2017. Aflibercept-Transport in und durch retinale Endothelzellen: Spielt der neonatale Fc-Rezeptor dabei eine Rolle?! *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 234, A9.
- DEISSLER, H. L., LANG, G. K. & LANG, G. E. 2014. Capacity of aflibercept to counteract VEGF-stimulated abnormal behavior of retinal microvascular endothelial cells. *Experimental eye research*, 122, 20-31.
- DEISSLER, H. L., LANG, G. K. & LANG, G. E. 2017. Neonatal Fc receptor FcRn is involved in intracellular transport of the Fc fusion protein aflibercept and its transition through retinal endothelial cells. *Experimental eye research*, 154, 39-46.
- DEUTSCHE OPHTHALMOLOGISCHE GESELLSCHAFT 2015. Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands: Die Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen

- Makuladegeneration: Therapeutische Strategien (Stand November 2014). *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 232, 202-210.
- EROTOCRITOU, P., ARYA, M., SHUKLA, S. & PATEL, H. 2007. Flow Cytometry. *Basic Science Techniques in Clinical Practice*, 38-47.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2012. *Eylea: EPAR - Product Information* [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/eylea-epar-product-information_en.pdf [Accessed 10.07.2019].
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. 2015. *Eylea (afibercept)* [Online]. Available: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002392/WC500135745.pdf [Accessed 30.10.2017].
- FALAVARJANI, K. G. & NGUYEN, Q. 2013. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye*, 27, 787.
- FATEH-MOGHADAM, S., HTUN, P., TOMANDL, B., SANDER, D., STELLOS, K., GEISLER, T., LANGER, H., WALTON, K., HANDSCHU, R. & GARLICH, C. 2007. Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*, 97, 974.
- FERRARA, N., MASS, R. D., CAMPA, C. & KIM, R. 2007. Targeting VEGF-A to treat cancer and age-related macular degeneration. *Annu. Rev. Med.*, 58, 491-504.
- FINGER, R. P., FIMMERS, R., HOLZ, F. G. & SCHOLL, H. P. 2011. Prevalence and causes of registered blindness in the largest federal state of Germany. *British journal of ophthalmology*, 95, 1061-1067.
- FINGER, R. P., FLECKENSTEIN, M., SCHOLL, H. P. N. & HOLZ, F. G. 2007. Pathophysiologie und Therapie der AMD: Therapeutischer Anti-VEGF-Einsatz in der Augenheilkunde. *Pharmazie in unserer Zeit*, 36, 424-430.
- GREEN, F. W., KAPLAN, M. M., CURTIS, L. E. & LEVINE, P. H. 1978. Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation: a possible contributor to prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage. *Gastroenterology*, 74, 38-43.
- HANHART, J., COMANESHTER, D. S. & VINKER, S. 2018. Mortality after a cerebrovascular event in age-related macular degeneration patients treated with bevacizumab ocular injections. *Acta ophthalmologica*, 96, e732-e739.
- HASAN, N., MCCOLGAN, P., BENTLEY, P., EDWARDS, R. J. & SHARMA, P. 2012. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 74, 230-240.
- HEIER, J. S., BROWN, D. M., CHONG, V., KOROBELNIK, J.-F., KAISER, P. K., NGUYEN, Q. D., KIRCHHOF, B., HO, A., OGURA, Y., YANCOPOULOS, G. D., STAHL, N., VITTI, R., BERLINER, A. J., SOO, Y., ANDERESI, M., GROETZBACH, G., SOMMERAUER, B., SANDBRINK, R., SIMADER, C. & SCHMIDT-ERFURTH, U. 2012. Intravitreal Afibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 119, 2537-2548.

- JENNINGS, L. K. 2009. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 102, 248-257.
- JULIEN, S., BIESEMEIER, A., TAUBITZ, T. & SCHRAERMAYER, U. 2014. Different effects of intravitreally injected ranibizumab and aflibercept on retinal and choroidal tissues of monkey eyes. *British Journal of Ophthalmology*, 98, 813-825.
- JURK, K. & KEHREL, B. 2010. Thrombozytensekretion. *Hämostaseologie*. Springer.
- KAMATH, S., BLANN, A. & LIP, G. 2001. Platelet activation: assessment and quantification. *European heart journal*, 22, 1561-1571.
- KEANE, P. A., DE SALVO, G., SIM, D. A., GOVERDHAN, S., AGRAWAL, R. & TUFAIL, A. 2015. Strategies for improving early detection and diagnosis of neovascular age-related macular degeneration. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 9, 353.
- KLETTNER, A., TAHMAZ, N., DITHMER, M., RICHERT, E. & ROIDER, J. 2014. Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. *British Journal of Ophthalmology*, 98, 1448-1452.
- KODJIKIAN, L., SOUIED, E. H., MIMOUN, G., MAUGET-FAÏSSE, M., BEHAR-COHEN, F., DECULLIER, E., HUOT, L. & AULAGNER, G. 2013. Ranibizumab versus bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration: results from the GEFAL noninferiority randomized trial. *Ophthalmology*, 120, 2300-2309.
- KRAUSE, L., YOUSIF, T., POHL, K. & GROUP, C. S. 2013. An epidemiological study of neovascular age-related macular degeneration in Germany. *Current medical research and opinion*, 29, 1391-1397.
- LEMMON, M. A. & SCHLESSINGER, J. 2010. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 141, 1117-1134.
- MACDONALD, D. A., MARTIN, J., MUTHUSAMY, K. K., LUO, J.-K., PYLES, E., RAFIQUE, A., HUANG, T., POTOCKY, T., LIU, Y. & CAO, J. 2016. Aflibercept exhibits VEGF binding stoichiometry distinct from bevacizumab and does not support formation of immune-like complexes. *Angiogenesis*, 19, 389-406.
- MARTIN, D. F., MAGUIRE, M. G., FINE, S. L., YING, G.-S., JAFFE, G. J., GRUNWALD, J. E., TOTH, C., REDFORD, M. & FERRIS, F. L. 2012. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*, 119, 1388-1398.
- MERTEN, M. & THIAGARAJAN, P. 2004. P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift für Kardiologie*, 93, 855-863.
- METZLER, P. & KRAUSE, B. 1997. Methodischer Standard bei Studien zur Therapieevaluation. *Methods of psychological Research*, 2, 55-67.
- MEYER, C., HELB, H.-M. & ETER, N. 2008. Monitoring von AMD-Patienten unter Anti-VEGF-Therapie. *Der Ophthalmologe*, 105, 125-142.
- MEYER, T., ROBLES-CARRILLO, L., ROBSON, T., LANGER, F., DESAI, H., DAVILA, M., AMAYA, M., FRANCIS, J. & AMIRKHOSRAVI, A. 2009. Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce

- thrombosis in FCGR2A transgenic mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 171-181.
- MINASSIAN, D. C., REIDY, A., LIGHTSTONE, A. & DESAI, P. 2011. Modelling the prevalence of age-related macular degeneration (2010–2020) in the UK: expected impact of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) therapy. *British Journal of Ophthalmology*, 95, 1433-1436.
- MOJA, L., LUCENTEFORTE, E., KWAG, K. H., BERTELE, V., CAMPOMORI, A., CHAKRAVARTHY, U., D'AMICO, R., DICKERSIN, K., KODJIKIAN, L. & LINDSLEY, K. 2014. Systemic safety of bevacizumab versus ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- NOVARTIS PHARMA. 2007. *Fachinformation Lucentis®* [Online]. Available: <https://www.augenklinikroth.de/uploads/media/LucentisFI.pdf> [Accessed 23.04.2018].
- PAPADOPOULOS, N., MARTIN, J., RUAN, Q., RAFIQUE, A., ROSCONI, M. P., SHI, E., PYLES, E. A., YANCOPOULOS, G. D., STAHL, N. & WIEGAND, S. J. 2012. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*, 15, 171-185.
- PARISI, L., FUHRER, R., ZINKERNAGEL, M. & ENZMANN, V. 2019. Ranibizumab and bevacizumab but not aflibercept inhibit proliferation of primary human retinal pigment epithelium in vitro. *Ophthalmologica*, 241, 137-142.
- PAULEIKHOFF, D., SCHEIDER, A., WIEDMANN, P., GELISKEN, F., SCHOLL, H., ROIDER, I., MOHR, A., ZLATEVA, G. & XU, X. 2009. Neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration in Deutschland. *Der Ophthalmologe*, 106, 242-251.
- PENG, L., BU, Z., ZHOU, Y., YE, X., LIU, J. & ZHAO, Q. 2014. Hemorrhagic events in cancer patients treated with aflibercept: a meta-analysis. *Tumor Biology*, 35, 9419-9427.
- PESCOVITZ, M. 2006. Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *American Journal of Transplantation*, 6, 859-866.
- PÖTZSCH, B. & GAWAZ, M. P. (eds.) 2010. *Hämostaseologie : 163 Tabellen; [Grundlagen, Diagnostik, Therapie]*, Berlin; Heidelberg: Springer.
- RANJBAR, M., BRINKMANN, M. P., ZAPF, D., MIURA, Y., RUDOLF, M. & GRISANTI, S. 2016. Fc receptor inhibition reduces susceptibility to oxidative stress in human RPE cells treated with bevacizumab, but not aflibercept. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 737-747.
- RANPURA, V., HAPANI, S. & WU, S. 2011. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Jama*, 305, 487-494.
- RENDU, F. & BROHARD-BOHN, B. 2001. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261-273.
- ROSENFELD, P. J., BROWN, D. M., HEIER, J. S., BOYER, D. S., KAISER, P. K., CHUNG, C. Y. & KIM, R. Y. 2006. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 355, 1419-1431.

- ROSENFELD, P. J., MOSHFEGHI, A. A. & PULIAFITO, C. A. 2005. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin®) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging Retina*, 36, 331-335.
- SACK, U. 2007. *Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*, Basel; Freiburg [Breisgau; Paris; London; New York; Bangalore; Bangkok; Singapore; Tokyo; Sydney, Karger.
- SARWAR, S., CLEARFIELD, E., SOLIMAN, M. K., SADIQ, M. A., BALDWIN, A. J., HANOUT, M., AGARWAL, A., SEPAH, Y. J., DO, D. V. & NGUYEN, Q. D. 2016. Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev*, 2, Cd011346.
- SCHLENKER, M. B., THIRUCHELVAM, D. & REDELMEIER, D. A. 2015. Intravitreal anti-vascular endothelial growth factor treatment and the risk of thromboembolism. *Am J Ophthalmol*, 160, 569-580.e5.
- SCHMID, M. K., BACHMANN, L. M., FAS, L., KESSELS, A. G., JOB, O. M. & THIEL, M. A. 2015. Efficacy and adverse events of aflibercept, ranibizumab and bevacizumab in age-related macular degeneration: a trade-off analysis. *Br J Ophthalmol*, 99, 141-6.
- SCHMIDT, R. F., LANG, F. & HECKMANN, M. 2011. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, Springer-Verlag.
- SCHNICHELS, S., HAGEMANN, U., JANUSCHOWSKI, K., HOFMANN, J., BARTZ-SCHMIDT, K.-U., SZURMAN, P., SPITZER, M. S. & AISENBREY, S. 2013. Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *British Journal of Ophthalmology*, 97, 917-923.
- SCHRADER, W. 2006. Altersbedingte Makuladegeneration. *Der Ophthalmologe*, 103, 742-748.
- SCHUMACHER, M. & SCHULGEN-KRISTIANSEN, G. 2008. *Methodik klinischer Studien: Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung*, Springer-Verlag.
- SINICROPE, F. A., WILLIAMSON, E. E. & BORGESON, D. D. 2013. Aflibercept and Its Role in the Treatment of Colorectal Cancer—Letter. *Clinical Cancer Research*, 19, 6057-6057.
- SMITH, GINA A., FEARNLEY, GARETH W., TOMLINSON, DARREN C., HARRISON, MICHAEL A. & PONNAMBALAM, S. 2015. The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. *Bioscience Reports*, 35, e00253.
- SOBOLEWSKA, B., GOLENKO, J., POESCHEL, S., GRIMMEL, C., GATSIU, A., SOPOVA, K., BIEDERMANN, T., SCHENKE-LAYLAND, K., STELLOS, K. & ZIEMSEN, F. 2018. Influence of aflibercept on platelet activation profile. *Exp Eye Res*, 175, 166-172.
- SOBOLEWSKA, B., GRIMMEL, C., GATSIU, A., SOPOVA, K., KLEIN, J., BIEDERMANN, T., STELLOS, K. & ZIEMSEN, F. 2015. Different Effects of Ranibizumab and Bevacizumab on Platelet Activation Profile. *Ophthalmologica*, 234, 195-210.

- SOBOLEWSKA, B., HEIDUSCHKA, P., BARTZ-SCHMIDT, K.-U. & ZIEMSEN, F. 2017. pH of anti-VEGF agents in the human vitreous: low impact of very different formulations. *International journal of retina and vitreous*, 3, 22.
- STELLOS, K., BIGALKE, B., STAKOS, D., HENKELMANN, N. & GAWAZ, M. 2010. Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, 205-207.
- STELLOS, K., LANGER, H., DAUB, K., SCHOENBERGER, T., GAUSS, A., GEISLER, T., BIGALKE, B., MUELLER, I., SCHUMM, M., SCHAEFER, I., SEIZER, P., KRAEMER, B. F., SIEGEL-AXEL, D., MAY, A. E., LINDEMANN, S. & GAWAZ, M. 2008. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*, 117, 206-15.
- STEWART, M. 2012. *Clinical and differential utility of VEGF inhibitors in wet age-related macular degeneration: Focus on aflibercept*.
- THÉORÉT, J.-F., CHAHROUR, W., YACOUB, D. & MERHI, Y. 2006. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. *British Journal of Pharmacology*, 148, 299-305.
- THOMAS, M., MOUSA, S. S. & MOUSA, S. A. 2013. Comparative effectiveness of aflibercept for the treatment of patients with neovascular age-related macular degeneration. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 7, 495.
- VAN CUTSEM, E., TABERNERO, J., LAKOMY, R., PRENEN, H., PRAUSOVÁ, J., MACARULLA, T., RUFF, P., VAN HAZEL, G. A., MOISEYENKO, V. & FERRY, D. 2012. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of Clinical Oncology*, 30, 3499-3506.
- VERHEUL, H. M., LOLKEMA, M. P., QIAN, D. Z., HILKES, Y. H., LIAPI, E., AKKERMAN, J.-W. N., PILI, R. & VOEST, E. E. 2007. Platelets take up the monoclonal antibody bevacizumab. *Clinical cancer research*, 13, 5341-5347.
- VINGERLING, J. R., DIELEMANS, I., BOTS, M. L., HOFMAN, A., GROBBEE, D. E. & DE JONG, P. T. V. M. 1995. Age-related Macular Degeneration Is Associated with Atherosclerosis The Rotterdam Study. *American Journal of Epidemiology*, 142, 404-409.
- WANG, J., XUE, Y., THAPA, S., WANG, L., TANG, J. & JI, K. 2016. Relation between Age-Related Macular Degeneration and Cardiovascular Events and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*, 2016, 8212063.
- WEIß, C. 2007. Studien verstehen (2): Prüfen der Signifikanz—Woher kommt das kleine „p“? *Via medici*, 12, 54-56.
- WU, J., UCHINO, M., SASTRY, S. M. & SCHAUMBERG, D. A. 2014. Age-Related Macular Degeneration and the Incidence of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 9.

- WURSTER, T., STELLOS, K., HAAP, M., SEIZER, P., GEISLER, T., OTTON, J., INDERMUEHLE, A., ISHIDA, M., SCHUSTER, A., NAGEL, E., GAWAZ, M. & BIGALKE, B. 2013. Platelet expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): An indicator for ACS? *International Journal of Cardiology*, 164, 111-115.
- YANCOPOULOS, G. D., DAVIS, S., GALE, N. W., RUDGE, J. S., WIEGAND, S. J. & HOLASH, J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242.
- YAO, J., WU, X., ZHUANG, G., KASMAN, I. M., VOGT, T., PHAN, V., SHIBUYA, M., FERRARA, N. & BAIS, C. 2011. Expression of a functional VEGFR-1 in tumor cells is a major determinant of anti-PIGF antibodies efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 11590-11595.
- ZIEGER, B., BALLMEIER, M., GERMERSHAUSEN, M., KÜHNE, T. & BERGMANN, F. 2018. Das thrombozytäre System. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Springer.
- ZIEMSEN, F., SOBOLEWSKA, B., DEISSLER, H. & DEISSLER, H. 2016. Safety of monoclonal antibodies and related therapeutic proteins for the treatment of neovascular macular degeneration: addressing outstanding issues. *Expert Opin Drug Saf*, 15, 75-87.
- ZUBA-SURMA, E. K., KUCIA, M., ABDEL-LATIF, A., LILLARD, J. W. & RATAJCZAK, M. Z. 2007. The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. *Folia histochemica et cytobiologica*, 45, 279-290.
- ZUO, P.-Y., CHEN, X.-L., LIU, Y.-W., XIAO, C.-L. & LIU, C.-Y. 2014. Increased risk of cerebrovascular events in patients with cancer treated with bevacizumab: a meta-analysis. *PLoS One*, 9, e102484.

7 Anhang

7.1 Material

Medikamente und -lösungen

Aflibercept	Eylea® Bayer Pharma, Berlin, Deutschland
Aflibercept-Lösung	164 mg Na ₃ PO ₄ , 23 mg NaCl, 0,5 g Saccharose und 0,3 µg Polysorbate in 10 ml PBS; HCl für pH 6,2
Bevacizumab	Avastin® Roche, Grenzach, Deutschland
Ranibizumab	Lucentis® Novartis Pharma GmbH, Deutschland
Rituximab	Roche Pharma, Basel, Schweiz

Agonisten

PAR-4-AP	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Thrombin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
TRAP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Fluoreszierende Immunglobuline

CD62P-FITC	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
CD42b-PE	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Aflibercept-FITC	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
IgG1-FITC	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
IgG1-PE	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA

PAC-1-FITC	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
SDF-1-FITC	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Geräte

Axon Blutzellmessgerät	Axon Lab AG Reichenbach/Stuttgart, Deutschland
FACSCalibur™ Analyzer	Becton-Dickinson, San Jose, Kalifornien, USA
ImageStream® MK II – multispectral Imaging Flow Cytometer	Amnis®, Seattle, Washington, USA

Institute

Breuninger Bau, S2-Labor der Augenlinik Tübingen	Schleichstraße 12/1 72076 Tübingen
FACS Core Facility der Universitäts-Hautklinik	Liebermeisterstraße 20 72076 Tübingen
Image Stream® Core Facility des Departm. für Frauengesundheit UKT	Silcherstraße 7/1 72076 Tübingen
Klinisches Forschungslabor der Thorax- Herz- und Gefäßchirurgie	Calwerstraße 7/1 72076 Tübingen

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Studie wurde in Zusammenarbeit von Frau Dr. med. Bianka Sobolewska, Fachärztin Universitäts-Augenklinik Tübingen, und Herr Prof. Dr. med. Focke Ziemssen, Oberarzt Universitäts-Augenklinik Tübingen, konzipiert.

Die Betreuung während der Durchführung der Experimente übernahm Dr. med. Bianka Sobolewska. Die Herstellung der Proben für die Experimente sowie die Messungen im FACS Durchflusszytometer wurden von mir, Judith Viola Golenko, durchgeführt. Die Betreuung der Messungen im FACS Durchflusszytometer erfolgte durch Cornelia Grimmel, *Flow Cytometry Core Facility Operator*. Die statistische Auswertung der Datenmenge, welche durch die Messungen im FACS Durchflusszytometer erhoben wurde, wurde von mir, Judith Viola Golenko, durchgeführt.

Die Messung der Proben im *ImageStream* wurden von Simone Pöschel, *Imaging Flow Cytometry Core Facility Operator*, durchgeführt, ebenso die Auswertung dieser Messungen und die Darstellungen dieser Messungen (Abb. 6, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 12 und Abb. 13)

Ort, Datum

Judith Viola Golenko

9 Veröffentlichungen

Der Artikel „*Influence of aflibercept on platelet activation profile*“ wurde im Oktober 2018 in der Fachzeitschrift „*Experimental Eye Research*“ veröffentlicht.

Danksagung

Meinen Dank möchte ich gerne all denjenigen aussprechen, die mich in jeglicher Weise unterstützt haben.

Besonderen Dank an Frau Dr. med. Bianka Sobolewska für die intensive Betreuung und Herr Prof. Dr. med. Focke Ziemssen für die Begleitung und das Vertrauen in mich als Doktorandin. Auch möchte ich Simone Pöschel und Cornelia Grimmel für die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten danken, sowie Irina Stingl für die Unterstützung bei den grafischen Darstellungen.

Des Weiteren danke ich meinem Mann und meiner Familie, welche mich immer wieder bestärkt und ermutigt haben.

