

Pharmakotherapie und Humanpharmakologische Untersuchungen bei  
Patienten mit DME (Diabetisches Makulaödem) und PDR  
(Proliferative Diabetische Retinopathie) anhand klinischer Parameter  
und inflammatorischer Biomarker



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

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Jessica Vögeler aus

Regensburg

im Jahr 2015

Promotionsgesuch eingereicht am 28.8.2015

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

## Danksagung

Ohne die Unterstützung vieler wunderbarer Freunde und Förderer wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein Dank geht allen voran an Hubert Stangl, der immer an meiner Seite stand und es hoffentlich noch lange tun wird. Prof. Färber danke ich für die Möglichkeit dieses Projekt verwirklichen zu dürfen und vor allem für die Geduld, die er für den langwierigen Prozess aufgebracht hat. Ein besonderer Dank geht an meine Kolleginnen Claudia Weiß und Karin Pohl für die unermüdliche Unterstützung, sowie Michael Eglmeier für das Salz in der Suppe.

Prof. Kees, Prof. Straub, Prof. Hanefeld, Prof. van der Giet, Prof. Maurer, Prof. Paul, Prof. Lang und PD Dr. Liakopoulos und Ihren Arbeitsgruppen möchte ich meinen Dank für die unkomplizierte Kooperation im Rahmen diese Arbeit zukommen lassen. Angelika Gräber sei ein besonderer Dank ausgesprochen.

Nicht vergessen werden darf meine Familie und meine Freunde, die mir allen Rückhalt gaben, den man sich wünschen kann. Ohne euch, wäre dieses Werk nicht möglich gewesen.

Es gibt in der Welt selten ein schöneres Übermaß als das der Dankbarkeit.

Jean de la Bruyere (1645-1696)

## Zusammenfassung

**Fragestellung:** Der Einsatz von Ranibizumab und Laserphotokoagulation hat sich bei der Therapie des Diabetischen Makulaödems (DMÖ) bewährt, die Wirkung bei Patienten mit Proliferativer Diabetischer Retinopathie (PDR) sowie der Zusammenhang mit Serumbiomarkern sind unklar. Die Veränderung von Biomarkern gesunder Probanden, verschiedenen Diabetesgruppen, Patienten mit Urtikaria oder Multipler Sklerose (MS) im Vergleich zu Patienten mit DMÖ ist eine weitere Fragestellung dieser Dissertation.

**Methodik:** In der multizentrischen, doppelt-maskierten, parallel-Gruppen, aktiv kontrollierten, klinischen Prüfung RELATION wurden Patienten mit Visusbeeinträchtigung auf Grund eines DMÖ im Verhältnis 2:1 entweder der Kombinationsgruppe (kombinierte Therapie aus Ranibizumab plus fokaler/grid Laser) oder der Lasergruppe (Scheininjektion plus fokaler/grid Laser) zugeteilt und bis zu 12 Monate beobachtet. Nach vier initialen Injektionen wurde bei Bedarf wiederbehandelt. Eine Subgruppe mit zusätzlich diagnostizierter PDR, erhielt zusätzlich eine panretinale Laserung zur Baseline. Der bestkorrigierte ETDRS-Visus wurde von zertifizierten Prüfern erhoben. Ein zentrales Reading Center wertete morphologische Parameter der bildgebenden Befunde (Fundusphotographie, Fluoreszeinangiographie und Optische Kohärenztomographie) aus. Serumproben der RELATION Patienten von Visite 1, Visite 6 und Visite 14 wurden mittels ELISA oder Luminex untersucht. Darüber hinaus wurden Biomarkermessungen von 32 gesunden Probanden, 30 frühen Diabetikern bzw. Patienten mit Glucoseintoleranz, 42 Proben von Diabetikern aus der Nephrologie, 40 Urtikariapatienten und 50 MS-Patienten durchgeführt. Die Serumkonzentrationen von IL-8, IL-17, MCP-1, VEGF, Apo A1, Apo A2, Apo B, Apo C2 and Apo E, sVCAM-1, sICAM-1 und IL-6 wurden bestimmt.

**Ergebnisse:** 128 Patienten wurden in die RELATION Studie randomisiert. In dieser Dissertation werden die Ergebnisse der 114 Patienten vorgestellt, von denen wenigstens bei Screening Biomarkerproben vorlagen. 76 Patienten wurden in die Kombinations- und 38 in die Lasergruppe randomisiert. Der bestkorrigierte Visus war am Ende des Beobachtungszeitraums mit +6,25 Buchstaben in der Kombigruppe dem Visus der Patienten in der Lasergruppe (+1,81 Buchstaben) signifikant überlegen (mittlere Änderung von Baseline,  $p=0,012$ , LOCF Methode). Die zentrale Netzhautdicke verringerte sich stärker in der Kombi- als in der Lasergruppe ( $-105,2 \mu\text{m}$  vs.  $-79 \mu\text{m}$ , mittlere Änderung von Baseline,  $p=0,333$ , LOCF). 23 Patienten hatten eine PDR bei Baseline (18 in der Kombigruppe und 5 in der Lasergruppe), was jedoch keinen Einfluss auf das Visusergebnis zeigte. Das Nebenwirkungsprofil unterschied sich nicht von früheren Studien, sowohl bei PDR als auch nicht-PDR Patienten. Die VEGF-Konzentration änderte sich nicht über die Zeit unter kombinierter Therapie, aber die Konzentration anderer Biomarker (z.B. VCAM-1). Es wurden keine Korrelationen zwischen den Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und Visus oder morphologischen Charakteristika gefunden. Diabetiker zeigten bei verschiedenen Krankheitsstadien im Vergleich zu gesunden Probanden und im Vergleich zu anderen entzündlichen Erkrankungen veränderte Biomarkerkonzentrationen.

**Schlussfolgerungen:** Die RELATION Studie zeigt, dass mit Kombinationstherapie aus Ranibizumab und Laser bessere funktionelle und morphologische Ergebnisse bei Patienten mit DMÖ erreicht werden, als mit alleiniger Lasertherapie. Wiederholte Gabe von Ranibizumab führt nicht zu verminderter Serum-VEGF-Konzentration. Unter den Biomarkern gibt es keine Prädiktoren für den Schweregrad der Diabetischen Retinopathie. Erkenntnisse zu veränderten Biomarkerkonzentrationen bei verschiedenen Diabetesstadien oder Urtikaria und MS im Vergleich zu gesunden Probanden sollten weiter untersucht werden.

1	Einleitung .....	10
1.1	Anatomie des Auges.....	10
1.2	Funktionen der Netzhautzellen und Sehvorgang .....	13
1.3	Diabetische Retinopathie: klinisches Bild, Häufigkeit, Auswirkung und Behandlung .....	14
1.3.1	Charakterisierung der diabetischen Retinopathie .....	15
1.3.2	Prävalenz und Inzidenz der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems .....	19
1.3.3	Einfluss der diabetischen Retinopathie auf den Visus.....	21
1.3.4	Behandlung der diabetischen Retinopathie .....	22
1.3.5	Wirkweise und Rolle der Lasertherapie und der VEGF-Inhibitoren insbesondere Ranibizumab in der Behandlung des diabetischen Makulaödems .....	23
1.4	Pathobiologie des Diabetes mellitus und Entstehung des Makulaödems .....	26
1.4.1	Diabetesbedingte Pathogenese und deren Folgen .....	26
1.4.2	Anfälligkeit der Retina gegenüber Hyperglykämie und Insulin.....	28
1.4.3	Bildung des diabetischen Makulaödems .....	28
1.4.4	Rolle des VEGF in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems .....	29
1.4.5	Rationale zur Auswahl der Biomarker .....	31
2	Methodik .....	33
2.1	CRFB002DDE13- RELATION: Eine klinische Prüfung zur Untersuchung von Ranibizumab in Kombination mit der Laserphotokoagulation beim diabetischen Makulaödem (DMÖ).....	33
2.1.1	Hintergrund der klinischen Prüfung .....	33
2.1.2	Studiendesign und Zielparameter .....	33
2.1.3	Ein- und Ausschlusskriterien.....	34
2.1.4	Vorzeitiges Beenden der klinischen Prüfung gemäß Prüfplan .....	34
2.1.5	Pseudonymisierung der Patienten.....	35
2.1.6	Behandlung der Patienten und Verblindung von Studienpersonal und Patienten .....	35
2.1.7	Durchführung der Behandlung .....	37
2.1.8	Weitere Behandlungsoptionen.....	37
2.1.9	Weitere Vorgaben des Prüfplans .....	37
2.1.10	Bestimmung der Endpunkte .....	41
2.1.11	Bestimmung der Sehschärfe .....	41
2.1.12	Bildgebende Befunde zur Bestimmung anatomischer Parameter .....	43
2.1.12.1	Farb-Fundusphotographie (FP) .....	43
2.1.12.2	Fluoreszenzangiographie (FLA).....	45
2.1.12.3	OCT-Messung zur Bestimmung der zentralen Retinadicke und weiterer Parameter .....	46
2.1.13	Sicherheit.....	53

2.1.14	Laborwerte.....	53
2.1.15	Intraokularer Druck .....	53
2.1.16	Standard-Ophthalmologische Untersuchungen .....	54
2.1.17	Vitalparameter .....	54
2.1.18	Dateneingabe und Analyse der Studienergebnisse, die unter 2.1.10 erhoben wurden .....	54
2.2	Biomarkeruntersuchungen.....	55
2.2.1	Probenentnahme, Aufbereitung und Lagerung.....	55
2.2.2	Bestimmung der Biomarkerkonzentration mit dem Luminex Gerät .....	56
2.2.2.1	Prinzip der Luminex® Messung: .....	56
2.2.2.2	Vorbereitung des Geräts und allgemeine Angaben zur Messung und Auswertung .....	56
2.2.2.3	Messung von IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1 und VEGF .....	57
2.2.2.4	Messung von sVCAM-1 und sICAM-1.....	58
2.2.2.5	Messung der Apolipoproteine .....	58
2.2.2.6	Messung von IL-6.....	59
2.3	Allgemeine Annahmen & Vergleichskollektive.....	59
3	Ergebnisse .....	61
3.1	Ergebnisse der klinischen Parameter der RELATION Studie.....	61
3.1.1	Baselinecharakteristika.....	61
3.1.2	Studiendauer und Behandlung.....	67
3.1.3	LOCF-Methode .....	70
3.1.4	Visusendpunkte .....	70
3.1.4.1	Primärer Endpunkt und Visusverlauf.....	70
3.1.4.2	Visusgewinn in Kategorien .....	74
3.1.5	Entwicklung der Retinadicke .....	75
3.1.6	Einfluss der Baselinecharakteristika auf die Ergebnisse .....	78
3.1.6.1	Betrachtung verschiedener DMÖ-Typen.....	78
3.1.6.2	Vorhandensein einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) .....	79
3.1.6.3	Vorbehandlung mit Lasertherapie .....	85
3.1.6.4	Einfluss von makulärer Ischämie und Retinopathiestadium bei Baseline auf den Visusgewinn an Monat 12 .....	88
3.1.6.5	Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse .....	88
3.1.7	Ergebnisse der Sicherheitsanalyse.....	89
3.2	Untersuchung der Biomarker der RELATION Patienten.....	89
3.2.1	IL-8.....	90
3.2.2	IL-10.....	92
3.2.3	IL-17A .....	93
3.2.4	MCP-1 .....	95

3.2.5	VEGF.....	98
3.2.6	Apo-AI.....	100
3.2.7	Apo-AII .....	102
3.2.8	Apo-B .....	104
3.2.9	Apo-CII .....	106
3.2.10	Apo-CIII .....	108
3.2.11	Apo-E .....	110
3.2.12	sVCAM-1 .....	111
3.2.13	ICAM-1 .....	114
3.2.14	IL-6.....	116
3.2.15	Überblick: Änderungen der Biomarkerkonzentrationen im Vergleich zu Baseline .....	118
3.2.16	Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen, Baselinecharakteristika und Ansprechen auf die Therapie.....	119
3.2.16.1	Biomarkerkonzentrationen der Patienten mit PDR .....	119
3.2.16.2	Verteilung der Retinopathiestadien und Biomarkerkonzentrationen.....	120
3.2.16.3	Verteilung der DMÖ-Typen und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 .....	122
3.2.16.4	Verteilung der Ischämiegrade und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1.....	124
3.2.17	Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und weiteren Baselinewerten (Visus, zentrale Retinadicke).....	124
3.2.18	Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen und Begleittherapien.....	124
3.2.19	Einfluss der Biomarkerkonzentrationen bei Baseline auf das Outcome.....	126
3.2.20	Zusammenfassung: Biomarkerkonzentrationen, Baselinecharakteristika und Outcome	127
3.3	Vergleich der Biomarkerkonzentrationen verschiedener Probanden- und Patientengruppen .....	128
3.3.1	IL-8.....	129
3.3.2	IL-10.....	131
3.3.3	IL-17A .....	133
3.3.4	MCP-1 .....	135
3.3.5	VEGF.....	137
3.3.6	Apo-AI.....	140
3.3.7	Apo-AII .....	143
3.3.8	Apo-B .....	146
3.3.9	Apo-CII .....	148
3.3.10	Apo-CIII .....	150
3.3.11	Apo-E .....	152
3.3.12	sVCAM-1 .....	154
3.3.13	sICAM-1.....	156

3.3.14	IL-6.....	158
3.3.15	Zusammenfassung der Kollektivvergleiche .....	161
4	Diskussion .....	163
4.1	Klinische Ergebnisse der RELATION Studie .....	163
4.2	Sicherheit der Therapie.....	172
4.3	Betrachtung der Biomarker in der RELATION Studie .....	174
4.3.1	Entwicklung der Biomarker über den Studienzeitraum.....	174
4.3.2	Biomarker im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen: Korrelation bei Visite 1 und Baseline .....	179
4.3.3	Biomarker und Begleittherapie: Signifikante Unterschiede .....	180
4.3.4	Biomarker im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen: Korrelation mit den Ergebnissen und der Injektionshäufigkeit .....	182
4.4	Diskussion der Ergebnisse der Kollektivvergleiche .....	184
5	Gesamtzusammenfassung.....	193
6	Fazit.....	195
7	Abkürzungsverzeichnis .....	196
8	Anhang .....	198
8.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	198
8.1.1	Einschlusskriterien .....	198
8.1.2	Ausschlusskriterien.....	199
8.2	Durchführung der Studienbehandlung.....	201
8.3	Information zur Sicherheit von Ranibizumab und Tabellen der unerwünschten Ereignisse .....	203
8.3.1	Sicherheitsprofil von Ranibizumab .....	203
8.3.2	Definitionen unerwünschter Ereignisse.....	206
8.3.3	Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse RELATION Studie .....	207
8.3.3.1	Cardiac Disorders .....	207
8.3.3.2	Eye Disorders .....	207
8.3.3.3	Gastrointestinal Disorders .....	207
8.3.3.4	General Disorders and administrative site Disorders .....	208
8.3.3.5	Hepatobiliary Disorders.....	208
8.3.3.6	Infections and Infestations.....	208
8.3.3.7	Metabolism and Nutrition Disorders .....	208
8.3.3.8	Musculoskeletal and Connective Tissue Disorders .....	208
8.3.3.9	Neoplasm benign, malignant and unspecified (incl. Cysts and Polyps).....	208
8.3.3.10	Nervous System Disorders .....	209
8.3.3.11	Vascular Disorders .....	209



8.3.4	Unerwünschte Ereignisse RELATON Studie.....	209
8.3.4.1	Blood and Lymphatic System Disorders.....	209
8.3.4.2	Cardiac Disorders .....	209
8.3.4.3	Ear and Labyrinth Disorders .....	209
8.3.4.4	Eye Disorders .....	209
8.3.4.5	Gastrointestinal Disorders .....	211
8.3.4.6	General Disorders and Administration Site Conditions .....	211
8.3.4.7	Allergic Conditions .....	211
8.3.4.8	Infections and Infestations.....	211
8.3.4.9	Injury, Poisoning and Procedural Complications.....	212
8.3.4.10	Investigations.....	212
8.3.4.11	Metabolism and Nutrition Disorders .....	212
8.3.4.12	Musculoskeletal and Connective Tissue Disorders .....	213
8.3.4.13	Nervous System Disorders .....	213
8.3.4.14	Psychiatric Disorders.....	213
8.3.4.15	Renal and Urinary Disorders .....	214
8.3.4.16	Reproductive System and Breast Disorders .....	214
8.3.4.17	Respiratory, Thoracic and Mediastinal Disorders .....	214
8.3.4.18	Skin and Subcutaneous Disorders .....	214
8.3.4.19	Vascular Disorders .....	214
8.4	Tabellen.....	215
9	Literaturverzeichnis.....	242

# 1 Einleitung

Diese Doktorarbeit beschreibt die Grundlagen des diabetischen Makulaödems (DMÖ) und der diabetischen Retinopathie (DR) und gibt einen Überblick über das Design, die Durchführung und die Ergebnisse einer klinischen Prüfung bei Patienten mit DMÖ (*RELATION*). In dieser klinischen Prüfung wurde die Wirksamkeit und Sicherheit des Anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) Antikörperfragments Ranibizumab auf das diabetische Makulaödem und auf Gefäßproliferationen im Bereich der Netzhaut untersucht. Die Ergebnisse der klinischen Prüfung werden in dieser Arbeit gezeigt und diskutiert. In der *RELATION* Studie wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen, die auf eine Reihe von Biomarkern untersucht wurden. Ein weiterer Teil der Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Biomarker mit verschiedenen Stadien der Erkrankung korrelieren und ob sich die Biomarkerkonzentration unter Therapie verändert. Darüber hinaus wurden die Messungen der Biomarkerkonzentrationen der DMÖ Patienten mit den Messergebnissen von gesunden Probanden und weiteren Patientengruppen verglichen (Patienten mit frühem Diabetes, Diabetiker mit Beteiligung der Niere, Urtikaria- und Multiple Sklerose-Patienten).

## 1.1 Anatomie des Auges

Um zu verstehen wie die DR und in Konsequenz ein DMÖ entsteht, ist es hilfreich kurz den anatomischen Aufbau des Auges zu betrachten.

Das Auge wird in drei Abschnitte eingeteilt:

- Äußere Augenhaut (Tunica externa)
- Mittlere Augenhaut (Tunica media)
- Innere Augenhaut (Tunica interna) [1, 2]

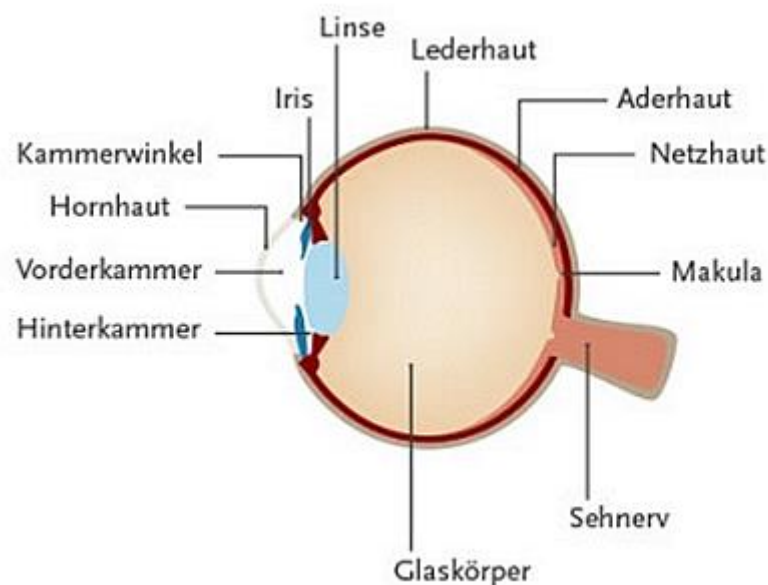


Abbildung 1 Betrachtung des Auges im Querschnitt. Mit freundlicher Genehmigung von Novartis Pharma GmbH

Die äußere Augenhaut besteht aus Sklera (Lederhaut) und Kornea (Hornhaut). Die mittlere Augenhaut setzt sich zusammen aus der Choroidea (Aderhaut), dem Corpus ciliare (Ziliarkörper) und der Iris (Regenbogenhaut), die die Pupille ausspart. Die innere Augenhaut besteht aus der Retina (Netzhaut) (Abbildung 1).

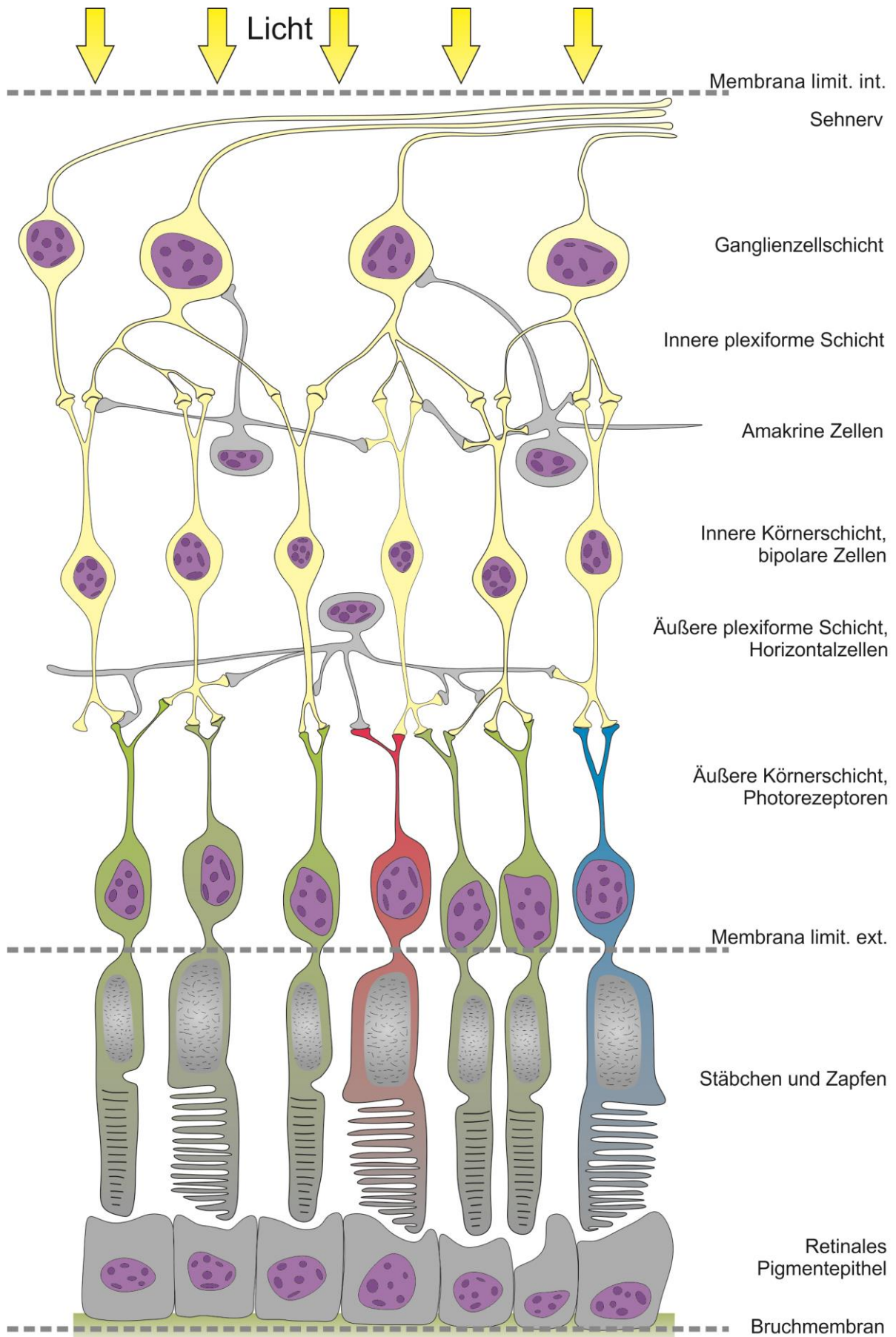
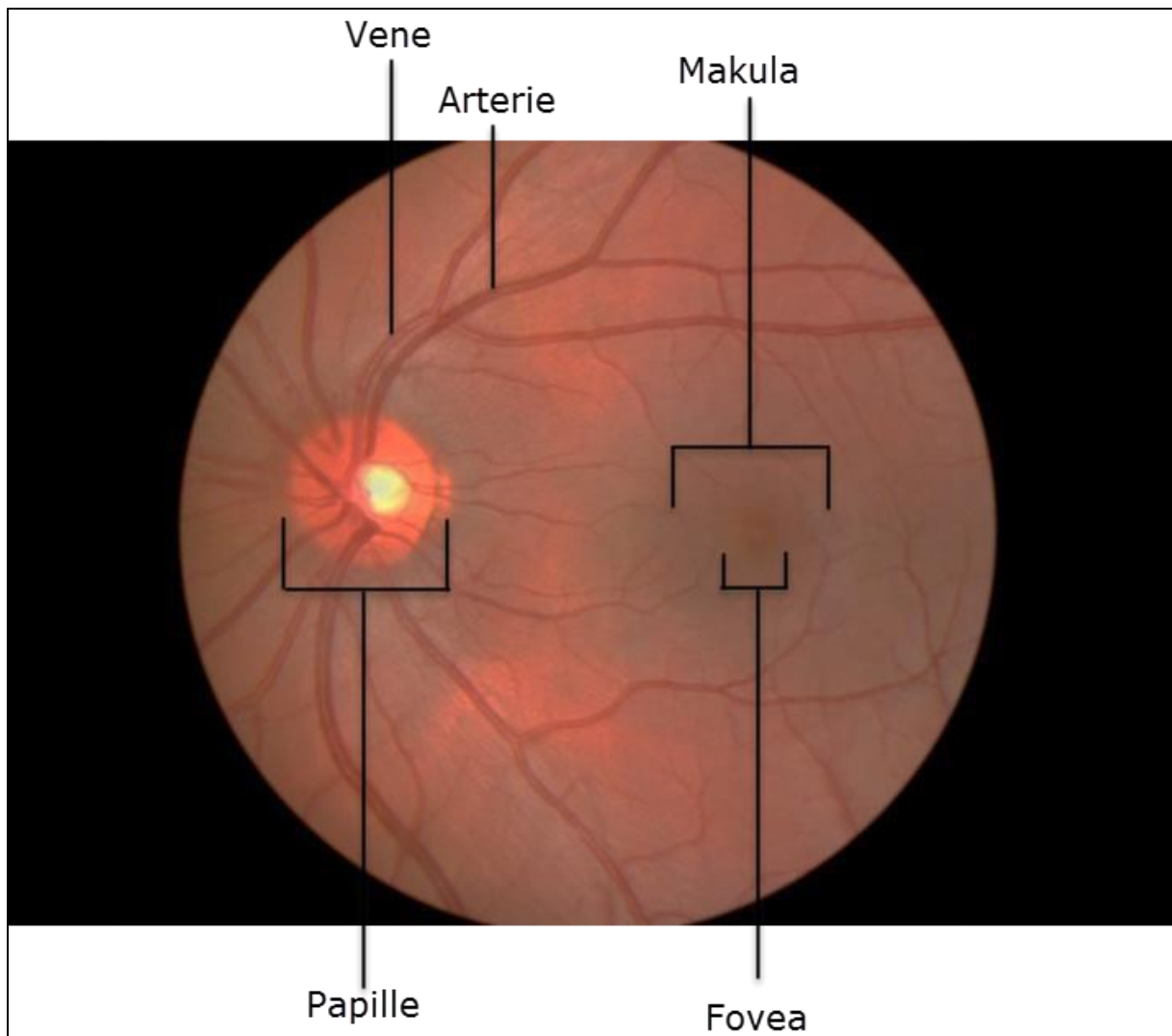


Abbildung 2: Struktur der Netzhaut, nach GK Lang [2]; Membrana limit. int.: Membrana limitans interna; membrana limit. ext.: membrana limitans externa

Die Retina wird in weitere funktionelle Einheiten unterteilt. Ein einfallender Lichtstrahl durchdringt zuerst Pupille, Linse und den Glaskörper, bevor er auf die erste Netzhautschicht, die innere Grenzmembran, trifft (Abbildung 2). Der inneren Grenzmembran sind folgende Schichten nachgelagert:

- die Nervenfaserschicht
- die Ganglienzellschicht
- die innere plexiforme Schicht mit Amakrinen Zellen
- die innere Körnerschicht mit bipolaren Zellen
- die äußere plexiforme Schicht mit Horizontalzellen
- die äußere Körnerschicht mit den Zellkernen der Photorezeptoren
- die äußere Grenzmembran (Membrana limitans externa)
- die eigentlichen Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen)
- Müllerzellen
- das retinale Pigmentepithel (RPE)
- und die Bruch-Membran.

Das RPE und Bruch-Membran liegen der Aderhaut (Choriokapillaris) fest auf und dienen der Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen [1, 3]. Die inneren Netzhautschichten werden nicht von der Aderhaut versorgt sondern durch kapillare Blutgefäße ausgehend von der Arteria centralis. Die Kapillaren sind zwischen innerer Nervenfaserschicht bis hin zur äußeren plexiformen Schicht lokalisiert.



**Abbildung 3: Blick auf Augenhintergrund (Fundusbild); die Fovea im Bereich der Makula liegt etwa 3 bis 4 mm temporal und etwas unterhalb der Papille (im Bild ist die Papille der helle Bereich, aus dem die Blutgefäße austreten); mit freundlicher Genehmigung der Novartis Pharma GmbH**

Eine Besonderheit im Aufbau der Retina stellt der Bereich der Makula dar (Abbildung 3). Vor allem die im Zentrum der Makula gelegene Fovea, der Bereich des schärfsten Sehens, ist von essentieller Bedeutung für den Sehvorgang. Dort verdünnt sich die Netzhaut so stark, dass nur noch Zapfen in hoher Dichte vorliegen und das Licht ungehindert von Kapillaren einfallen kann. Darüber hinaus sind die Zapfen im Bereich der Fovea einzeln innerviert, was für eine schnelle Reizweiterleitung sorgt. Im Gegensatz dazu leiten Nervenzellen in den äußeren Bereichen die Signale von mehreren Photorezeptoren weiter [2].

Die Makula befindet sich in der Netzhautmitte. Die Fovea centralis liegt 3-4 mm temporal und etwas unterhalb der Papille (Sehnerv). Die Größe der Fovea entspricht ungefähr einem Papillendurchmesser (circa 1,5- 1,9 mm) und ist frei von Gefäßen [2].

## **1.2 Funktionen der Netzhautzellen und Sehvorgang**

In der Netzhaut befinden sich verschiedene Zellklassen, die für den Sehvorgang von unterschiedlicher Bedeutung sind. Die zentrale Rolle übernehmen die Photorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen), die dem RPE anliegen und Ausläufer bis zur äußeren plexiformen Schicht haben. Helligkeit wird über die

Photopigmente in den Stäbchen erfasst. Für Verarbeitung des Farbsehens und der Sehschärfe sind die Zapfen verantwortlich. Weitere Neuronen sind die Bipolaren, die Horizontal-, die Amakrinen- und die Ganglion-Zellen, die den Photorezeptorzellen vorgelagert sind. Einfallendes Licht durchdringt diese drei Schichten bevor es zu den Photorezeptorzellen gelangt (sogenannte Inversion der Retina). Für die Sehfunktion sind vier Neuronen nötig: das erste Neuron ist ein Stäbchen oder Zapfen. Dieses überträgt das Signal auf ein zweites Neuron, eine bipolare Zelle. Es folgt das dritte Neuron, eine Ganglienzelle, deren Ausläufer sich zur Nervenfaserschicht des Sehnervs bündeln. Der Sehnerv tritt an der Papille aus dem Auge aus und die Nervenfasern ziehen sich hin bis zum Corpus geniculatum im Gehirn. Dort folgt die Signalweiterleitung auf das vierte Neuron. Dieses vierte Neuron erstreckt sich als Sehnervenbündel des Radiatio optica bis zur Sehrinde, wo die Umwandlung der Signale in Seheindrücke stattfindet.

Die oben genannten Amakrinen- und Horizontalzellen regulieren den lateralen laufenden Signalfluss zwischen den übrigen Neuronen [1, 2, 4, 5]. Gewebsständige Makrophagen, sogenannte Microglia, exprimieren proinflammatorische Zytokine und übernehmen die Phagozytose von nekrotischen und apoptotischen Zellen.

Vaskuläre Strukturen sind von den anderen funktionellen Einheiten der Retina durch die Blut-Retina-Schranke getrennt. Als äußere Blut-Retina-Schranke wird die dichte Zellschicht der RPE Zellen bezeichnet, da sie die Aderhaut von den darüberliegenden Netzhautstrukturen abgrenzt. Die innere Blut-Retina-Schranke stellt die Barriere zwischen neurosensorischer Retina und retinalen Gefäßanteilen dar. Die Kapillargefäße sind aus Endothelzellen geformt, die über sogenannte *tight-junctions* eng verbunden sind. Tight junctions bestehen aus speziellen Transmembranproteinen, die den Raum zwischen den Endothelzellen abdichten, so dass die Diffusion zwischen den Endothelzellen ins umliegende Gewebe stark reduziert wird [6]. Die Endothelzellen sind von einer Basalmembran umgeben. Perizyten sitzen der Basalmembran auf und stabilisieren die Gefäße. Perizyten und Gefäßendothelzellen sind für Versorgung und Abtransport von Nährstoffen zuständig [1, 2, 4, 5]. Zwei Gliazelltypen (Astrozyten und Müllerzellen) werden von den Gefäßen versorgt und stellen so die Versorgung der übrigen Netzhaut sicher [7]. Die Integrität von innerer und äußerer Blut-Retina-Schranke ist essenziell für die Versorgung der Retina und den Abtransport von Abbauprodukten [6].

Bevor die pathobiologischen Veränderung der Retina bei Diabetespatienten betrachtet werden, folgen in den kommenden Kapiteln die makroskopischen Vorgänge bei DR, deren Häufigkeit und deren Auswirkung auf die Sehschärfe (Visus). Visus- und makroskopische Veränderungen sind essentielle Parameter um das Fortschreiten der diabetischen Retinopathie zu charakterisieren und um die Effektivität von Therapien im Alltag und in klinischen Prüfungen zu beurteilen. Die Bestimmung der Sehschärfe wird in Kapitel 2.1.11 beschrieben.

### **1.3 Diabetische Retinopathie: klinisches Bild, Häufigkeit, Auswirkung und Behandlung**


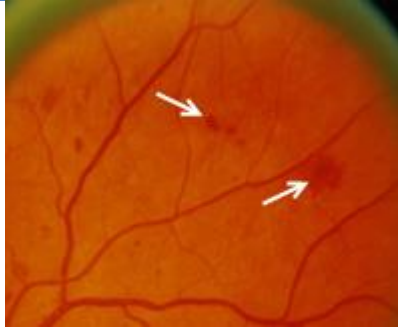
Die Diagnose DR wird anhand mikrovaskulärer Veränderungen der retinalen Kapillaren gestellt.


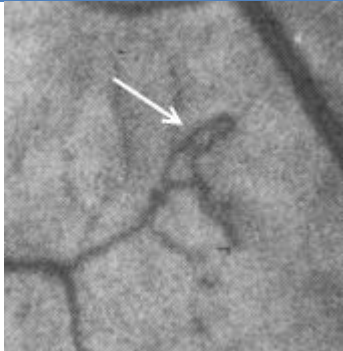
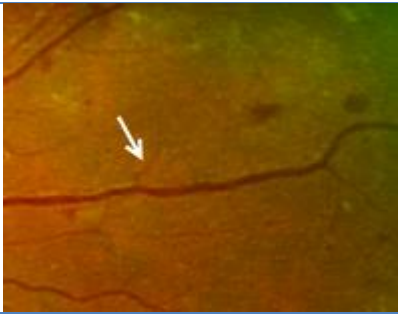
Als Folge von diabetesbedingter Unterversorgung und instabilen Gefäßen können sich in den Anfangsstadien Microaneurysmen, harte Exsudate (Ablagerungen von Lipiden in der Netzhaut), intraretinale Blutungen und Cotton-Wool-Herde (Nervenfaserinfarkte, so benannt nach ihrem charakteristischem Aussehen auf dem Fundusbild) manifestieren. In späteren Stadien folgen Kapillarverschlüsse und Ischämie [2]. Die Auswirkungen auf die Sehschärfe werden in Kapitel 1.3.3 erläutert.

Die DR wird in zwei Stadien eingeteilt: die nicht proliferative DR (NPDR) Form, die in das Stadium der proliferativen DR (PDR) übergehen kann. Das diabetische Makulaödem oder eine ischämische Makulopathie können unabhängig vom DR Stadium auftreten. Im folgenden Kapitel, werden die Stadien genauer charakterisiert [2].

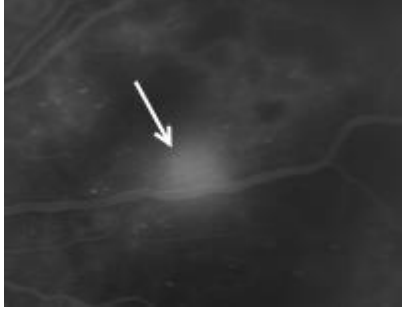


### 1.3.1 Charakterisierung der diabetischen Retinopathie

DR und DMÖ sind durch bestimmte Veränderungen an der Netzhaut charakterisiert, die in Tabelle 1 und Tabelle 2 auf den kommenden Seiten zusammengefasst sind.

Stadium der Retinopathie	Veränderungen an der Netzhaut	Beispielbefund
<b>Nicht proliferative DR (NPDR)</b>		
Mild	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mindestens 1 Mikroaneurysma</li> </ul>	 <p>Abbildung 4: Fluoreszenzangiographie (FLA) einer milden NPDR; der Pfeil markiert ein Mikroaneurysma; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
Mäßig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• leichte intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in vier Quadranten</li> <li>• mittelschwere Blutungen in zwei bis drei Quadranten</li> <li>• Schwankungen des venösen Gefäß-Kalibers in einem Quadrant</li> </ul>	 <p>Abbildung 5</p>

		 <p><b>Abbildung 6</b></p> <p>Beide Abbildungen: Fundusphotographien des Stadiums mäßiger NPDR; Pfeile markieren IRMA, mittelschwere Blutungen und Kaliberschwankungen; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
Schwer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mittelschwere Blutungen in 4 Quadranten</li> <li>• Schwankung des venösen Gefäß-Kalibers in 2 Quadranten</li> <li>• Mittelschwere IRMA in 1 Quadrant</li> </ul>	 <p><b>Abbildung 7: Beispiel für eine mittelschwere IRMA (Pfeil) bei einem Patienten mit einer schweren NPDR; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</b></p>
<b>Proliferative DR (PDR)</b>		
Mild	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht papilläre Gefäßneubildung &lt; 0,5 Papillenflächen in einem oder mehreren Quadranten (nicht papillär: ohne Beteiligung der Papille)</li> </ul>	



		 <p>Abbildung 8: Fundusaufnahmen (oben) und FLA (unten) eines Patienten mit milder PDR; der Pfeil markiert das neue Gefäß bzw. die Leckage daraus; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
Mäßig	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht papilläre Gefäßneubildung <math>\geq 0,5</math> Papillenflächen in einem oder mehreren Quadranten</li> <li>• Papilläre Gefäßneubildung <math>&lt; \frac{1}{3}</math> - <math>\frac{1}{4}</math> Papillenflächen</li> </ul>	 <p>Abbildung 9: Fundusaufnahmen eines Patienten mit mäßiger PDR; die neugebildeten Gefäße nehmen einen großen Teil des Fundus ein; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
Hochrisiko	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papilläre Gefäßneubildung <math>\geq \frac{1}{3}</math> - <math>\frac{1}{4}</math> Papillenflächen</li> <li>• Glaskörperblutung mit jeglicher Art von Gefäßneubildung</li> </ul>	 <p>Abbildung 10 zeigt massive Proliferationen auf dem gesamten Fundus inklusive Gefäßneubildungen im Bereich der Papille</p>

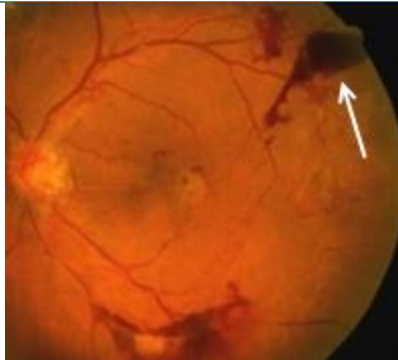
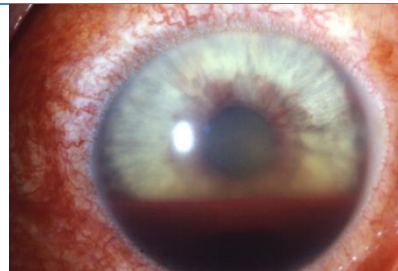


		 <p>Abbildung 11 zeigt vor allem Glaskörperblutungen</p> <p>Beide Abbildungen Fundusaufnahmen eines Patienten mit Hochrisiko PDR; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
<p><b>Rubeosis iridis</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neubildung von Gefäßen in der Iris und dadurch Gefahr eines akuten Winkelblockglaukoms durch Verschluss des Kammerwinkels; Optikusneuropathie kann die Folge sein</li> </ul>	 <p>Abbildung 12: Patient mit Rubeosis Iridis und akuter Einblutung in die Iris; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>

Tabelle 1: Veränderungen der Netzhaut bei diabetischer Retinopathie: nach GK Lang [2]

Stadium der Makulopathie	Veränderung der Netzhaut	
<p>Klinisch signifikantes Makulaödem</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ödem der Netzhaut innerhalb von 500 µm vom Zentrum der Makula</li> <li>• Harte Exsudate innerhalb von 500 µm vom Zentrum der Makula mit angrenzendem Ödem</li> <li>• Ödem von 1 Papillenfläche, oder zumindest teilweise innerhalb eines Papillendurchmessers vom Zentrum der Makula entfernt</li> </ul> <p>Kleinere Ödeme, oder Ödeme außerhalb 500 µm um das Zentrum der Makula werden als klinisch nicht signifikant bezeichnet.</p>	 <p>Abbildung 13</p>

		 <p><b>Abbildung 14</b></p> <p>Beide Fundusaufnahmen zeigen ein klinisch signifikantes DMÖ; harte Exsudate und das Ödem sind mit Pfeilen markiert; mit freundlicher Genehmigung von GE Lang (2012)</p>
Ischämische Makulopathie	Vergrößerte foveale avaskuläre Zone durch Verschluss von Kapillaren	

**Tabelle 2: Veränderungen der Netzhaut bei diabetischer Makulopathie: nach GK Lang [2]**

Eine weitere gängige Einteilung des DMÖ ist die Einteilung nach Leckagetyp mittels Fluoreszein Angiographie (die Methode wird in Kapitel 2.1.12 näher beschrieben).

Klassischerweise unterscheidet man zwei Ödemtypen:

- Fokales Ödem: die Leckagequellen kann eindeutig identifiziert werden: punktförmige Flüssigkeitsaustritte aus den Netzhautkapillaren
- Diffuses Ödem: die Leckagequellen können nicht eindeutig identifiziert werden: der Flüssigkeitsaustritt kann keiner eindeutigen Quelle zugeordnet werden, sondern tritt diffus in die Netzhaut aus

Darüber hinaus gibt es noch eine Mischform dieser beiden DMÖ-Typen [8].

Diabetes mellitus kann neben der DR auch zu folgenden pathologischen Veränderungen führen: Sicca-Symptomatik, Xanthelasma (plattenförmige Ablagerung von Cholesterin in Speicherzellen im Bereich der Augenlider), transitorische Refraktionsänderung (vorübergehend geänderte Lichtbrechung der Linse), Katarakt, Glaukom, Optikusneuropathie oder Augenmuskelparesen [2].

### **1.3.2 Prävalenz und Inzidenz der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems**

Nach der klinischen Charakterisierung der DR, werden in diesem Kapitel die Prävalenz und Inzidenz der verschiedenen Stadien beschrieben.

Die DR ist eine der häufigsten mikrovaskulären Folgeerkrankung des Diabetes mellitus und zählt zu den häufigsten Erblindungsursachen Deutschlands mit einem Anteil von 17 % aller Erblindungen 2002 [9-13].

In einer schwedischen Studie mit 251 386 Einwohnern, die 2012 veröffentlicht wurde [14], waren 12026 Personen von Diabetes mellitus betroffen (4,8 %). Eine Prävalenz von 41,8 % für DR bei Typ 1 Diabetikern wurde ermittelt, wobei bei 12,1% die Diagnose visusbeeinträchtigende DR und bei 1,6 % eine visusbeeinträchtigende Makulopathie vorlag. Bei Typ 2 Diabetikern lag die Prävalenz für DR bei

27,9 % mit 5 % Visusbeeinträchtigung auf Grund einer DR. 2,6 % der Typ 2 Diabetiker waren von einer visusbeeinträchtigende Makulopathie betroffen.

Dank der Wisconsin Epidemiologie Studie zur diabetischen Retinopathie sind mittlerweile 25-Jahresdaten zur Entwicklung der DR und DMÖ bei Typ-1 Diabetikern bekannt [15]. In regelmäßigen Abständen wurden Augenuntersuchungen bei 3719 Patienten durchgeführt, die vor Ihrem 30. Lebensjahr die Diagnose Typ 1 Diabetes erhalten.

Krankheitsdauer T1 DM (in Jahren)	Prävalenz der Visusbeeinträchtigung (in %) in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Diagnosestellung			
	1922 – 1959	1960 – 1969	1970 – 1974	1975 – 1980
10 – 14	2,5	5,4	1,3	n.a.
15 – 19	n.a.	13	2	4
20 – 24	17	12,5	2	n.a.
25 – 29	21	7	n.a.	6
30 – 34	16	15	9	n.a.
≥ 35	28	8	n.a.	n.a.

**Tabelle 3: Prävalenz der Visusbeeinträchtigung in der Wisconsin Epidemiologie Studie aufgetragen in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer des Typ 1 Diabetes mellitus. T1DM: Typ 1 Diabetes mellitus, n.a.: not available**

Nach einer 25-jährigen Beobachtungszeit lag bei 48 % der Patienten eine PDR vor und bei 24 % ein Makulaödem. Eine Visusbeeinträchtigung wurde bei 7 % der Patienten vor (Tabelle 3) festgestellt. Bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von 15-19 Jahren war eine Visusbeeinträchtigung bei 2-13% der Diabetiker vorhanden (bei Diagnose zwischen 1960-69: 13 %, zwischen 1970-74: 2 % und 1975-1979: 4 %), bei Patienten mit einer Krankheitsdauer von 25-29 Jahren zwischen 6 und 21 % [15]. Die Studie zeigte, dass die Prävalenz einer Visusbeeinträchtigung sank, abhängig davon in welchem Zeitraum die Diagnose gestellt wurde. Das lag vermutlich daran, dass Patienten, die in den 70ern und 80ern diagnostiziert wurden eine bessere Einstellung von HbA1c und Blutdruck erhielten, als Patienten, die vor 1970 diagnostiziert wurden.

Inzidenz und Prävalenz einer kanadischen DMÖ-Kohorte		
	Patienten mit DMÖ <sup>1</sup> (n=1.316)	Patienten mit VI wegen DMÖ <sup>1</sup> (<20/40) (n=215)
Visusbeeinträchtigung (VI) <sup>2</sup>	829 (63 %)	-
Prävalenz	15,7%	2,56 %
Inzidenz (jährlich)	-	0,37 %

**Tabelle 4: Inzidenz und Prävalenz von DMÖ und DMÖ mit Visusbeeinträchtigung eine kanadischen Kohortenstudie mit Typ 1 und Typ 2 Diabetikern. VI: Visusbeeinträchtigung (visual impairment)**

In einer aktuellen kanadischen Kohortenstudie wurde für Patienten mit Typ 1 oder 2 Diabetes mellitus die Prävalenz eines diabetischen Makulaödems mit 15,7 % bestimmt. Bei 2,56 % der Patienten mit DMÖ lag eine Visusbeeinträchtigung vor

(Visus <20/40, 73 Buchstaben) [16] (Tabelle 4). Auch auf Grundlage eines britisches Registers wurden aktuelle Zahlen für das Auftreten von DR, PDR und Makulopathie bei Diabetikern veröffentlicht [17]. Von 19 044 gescreenten Diabetikern hatten 2,89 % eine Makulopathie (Visus < 20/40 und charakteristische Merkmale im Fundusphoto) und keine Hintergrund-DR (Hintergrund-DR definiert als: Anwesenheit von mindestens einem Mikroaneurysma und/oder retinaler Blutung). Bei Vorhandensein einer DR an nur einem Auge, wurde bei 7,13 % der Patienten eine Makulopathie festgestellt. Wurde an beiden Augen eine DR diagnostiziert, stieg die Rate der Patienten mit Anzeichen einer Makulopathie auf 21,8 %. Eine PDR lag bei 0,07 % der Diabetiker ohne Hintergrund-

DR vor. War ein Auge von DR betroffen, hatten 0,11 % eine PDR. Bei 1,07 % der Patienten mit PDR, waren beiden Augen mit einer DR diagnostiziert.

Fasst man diese aktuellen Arbeiten zusammen, kann man momentan von einer Prävalenz einer Visusbeeinträchtigung auf Grund eines DMÖ von etwa 2-3 % der Diabetiker ausgehen. Der Anteil an Patienten mit Visusbeeinträchtigung wegen DMÖ steigt mit der Diabetesdauer (7 % bei 25jähriger Diabetesdauer bei Typ1 Diabetikern) und nimmt mit zusätzlichem Vorliegen einer DR (7-22 %) zu.

Im nachfolgenden Kapitel wird näher darauf eingegangen, welche pathologischen Veränderungen bei Diabetikern zu einer Sehbeeinträchtigung führen.

### **1.3.3 Einfluss der diabetischen Retinopathie auf den Visus**

Die Sehschärfe kann bei Patienten mit DR durch folgende pathologischen Begebenheiten beeinträchtigt werden: Makulaödem, Glaskörperblutung, Ischämie und epiretinale Membranen im Bereich der Makula [4].

Eine Ansammlung von Flüssigkeit oder Blut in der Retina bei einem Makulaödem oder einer Glaskörperblutung, führt zu veränderter Lichtbrechung. Der Patient sieht verschwommen, da die Fokussierung auf die Netzhaut nicht mehr möglich ist. Allerdings kann eine Flüssigkeitsansammlung in der Netzhaut noch weitere Auswirkungen haben [4].

Eine Flüssigkeitsansammlung:

- verändert die vorhandene Ionenkonzentration, die zum Erhalt des Aktionspotentials nötig ist
- presst durch den erhöhten Druck Neuronen zusammen, so dass die Funktionalität (irreversibel) gestört wird
- stört den Neurotransmitteraustausch von Glutamat und Glutamin zwischen den Gliazellen und den Neuronen, wodurch die Erregbarkeit der Zellen erschwert wird
- enthält schädliche Aminosäuren, Antikörper oder inflammatorische Zellen, die sich negativ auf die Funktion der Neuronen auswirken, woran diese zu Grunde gehen können.

Werden Neuronen irreversibel zerstört, bleibt der Visus permanent beeinträchtigt, auch wenn kein Ödem mehr vorhanden ist.

Darüber hinaus kann auch eine Ischämie, hervorgerufen durch mangelnde Versorgung auf Grund unzureichend perfundierter oder verschlossener Gefäße, die Wirkweise der Neuronen beeinträchtigen. Die Versorgung der Neuronen nimmt wegen der Ischämie ab. In letzter Konsequenz können Neuronen wegen mangelnder Versorgung zu Grunde gehen. Der Visus ist im Bereich der zerstörten Neurone unwiederbringlich verloren.

Ein weiteres Phänomen, das beim Fortschreiten der DR auftritt, ist die Entwicklung von Myofibroblasten-ähnliche Eigenschaften der RPE Zellen. In Folge können die veränderten RPE in den Glaskörper einwandern. Die eingewanderten RPE Zellen führen zur Bildung von sub- und epiretinalen Membranen (PVR = proliferative Vitreoretinopathie). Diese starren Membranstrukturen können Kontraktionen der Netzhautoberfläche hervorrufen, die das Gesichtsfeld verzerren oder die Netzhaut abheben. Die operative Entfernung der Membranen im Bereich der Makula kann zum Wiederherstellen der Sicht ohne Verzerrung führen. Bei der Operation wird der Glaskörper entfernt (Vitrektomie) und teilweise auch die Membranen, die den Zug ausüben, mechanisch beseitigt (Netzhautpeeling). Der teilweise oder ganz entfernte Glaskörper wird durch Ringer-Lösung, Gas oder

Silikonöl ersetzt [2], die teilweise wieder entfernt werden müssen, sobald sich das Glaskörpergewebe nachbildet.

Eine weitere Komplikation der DR stellt das Einsprossen von Netzhautgefäßen in den Glaskörper dar. Dafür muss der Glaskörper an der Netzhaut anliegen, wie es bei den meisten Menschen der Fall ist. Neu gebildete Netzhautgefäße sind meist unzureichend ausgebildet, wodurch es leicht zu Glaskörperblutungen kommen kann. Der dadurch erhöhte Augeninnendruck und die Blutbestandteile stellen eine Gefahr für Sehnerv und Netzhaut dar und müssen schnellstmöglich mittels Vitrektomie entfernt werden. Darüber hinaus können an den proliferativen Gefäßen fibrotische Veränderungen stattfinden, die Netzhaattraktionen und die Entwicklung einer traktiven Netzhautablösung (Amotio Retinae) begünstigen. Bei einer traktiven Amotio Retinae üben die Glaskörperstränge entlang der Proliferationen einen Zug auf die Netzhaut aus. Es kann zur Netzhautablösung kommen, die ebenfalls mit einer Vitrektomie behandelt werden muss [2].

Um Komplikationen und irreversible Sehschäden zu verhindern, ist es von enormer Bedeutung vorhandene Ödeme zu behandeln, bevor es zu irreversiblen Schäden kommt. Proliferationen gilt es vorzubeugen um Blutungen und fibrotische Vorgänge zu verhindern (siehe Kapitel 1.3.4).

Im folgenden Kapitel wird zusammengefasst mit welchen Therapien neben der Vitrektomie die Komplikationen der DR und das DMÖ behandelt werden können.

### **1.3.4 Behandlung der diabetischen Retinopathie**

Die diabetische Retinopathie ist in der Regel lange symptomfrei, da, solange nur ein Auge betroffen ist, das gesunde Auge die Defizite ausgleichen kann. Zu einer Sehverschlechterung kommt es häufig erst, wenn die Makula mit betroffen ist oder Glaskörperblutungen auftreten [4, 18, 19]. Daher ist es einerseits wichtig, regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen wahrzunehmen, andererseits Risikofaktoren wie chronische Hyperglykämie, arterielle Hypertonie oder Hyperlipidämie zu behandeln [19]. Eine systemische Therapie der diabetischen Retinopathie gibt es nicht. Es wurde jedoch bewiesen, dass intensive Blutzucker-, Blutdruck- und Lipidkontrolle das Krankheitsgeschehen positiv beeinflussen können [20-25].

Lokal werden je nach Schweregrad der diabetischen Retinopathie Teile der Netzhaut mit Laser behandelt oder anti-VEGF (VEGF: vascular endothelial growth factor) Medikamente eingesetzt [19, 26, 27].

In den aktuellen Stellungnahmen der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der diabetischen Makulopathie vom Dezember 2010 und April 2013 werden für die Behandlung eines klinisch signifikanten diabetischen Makulaödems mit fovealer Beteiligung VEGF-Inhibitoren als sinnvolle Therapieoption eingestuft [27, 28] (siehe Kapitel 1.3.5). Dabei soll bei erster Indikationsstellung die anti-VEGF Therapie mit vier monatlichen Injektionen in den Glaskörper (intravitreal) starten. Bei weiterer Krankheitsaktivität folgen zwei weitere monatliche Injektionen. Sollte das Krankheitsgeschehen daraufhin immer noch aktiv sein, folgen weitere Einzelinjektionen. Tritt nach einer stabilen Phase ohne Krankheitsaktivität, während der nicht therapiert wurde, erneut Aktivität auf, wird mit zwei monatlichen Injektionen behandelt.

Indikationen zur Lasertherapie bei NPDR (Tabelle 5), PDR (Tabelle 6) und diabetischer Makulopathie (Tabelle 7) werden wie folgt empfohlen:

<b>NPDR-Stadium</b>	Behandlung
<b>Mild</b>	Keine Laserkoagulation
<b>Mäßig</b>	Keine Laserkoagulation
<b>Schwer</b>	Panretinale Laserkoagulation, insbesondere bei Risikopatienten mit: <ul style="list-style-type: none"> <li>• mangelnder Compliance</li> <li>• beginnende Katarakt mit erschwertem Funduseinblick</li> <li>• Risiko-Allgemeinerkrankungen, speziell: arterielle Hypertonie</li> <li>• Schwangerschaft</li> </ul>

**Tabelle 5: Indikationen zur Behandlung mit Lasertherapie in den NPDR-Stadien**

<b>PDR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neovaskularisation an der Papille</li> <li>• Periphere Neovaskularisation &gt; 1/2 Papillendurchmesser</li> <li>• Präretinale Blutung</li> <li>• Rubeosis iridis</li> </ul>
------------	--

**Tabelle 6: Indikationen zur Lasertherapie bei PDR**

<b>Fokales diabetisches Makulaödem</b> [26]	Gezielte Laserkoagulation wird empfohlen bei Vorliegen eines Visus bedrohenden klinisch signifikanten Makulaödems: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mit umschriebenen Ödem-Zone(n)</li> <li>• Die in Kombination auftreten mit Mikroaneurysmen, intraretinalen Blutungen und harten Exsudaten, die ganz oder teilweise innerhalb eines Papillendurchmessers von der Foveola entfernt liegen</li> <li>• unabhängig vom Visus</li> </ul>
<b>Diffuses diabetisches Makulaödem</b> [29, 30]	Gitterförmige ( <i>grid</i> -) Laserkoagulation optional, da Studienergebnisse nicht eindeutig sind.
<b>Ischämische diabetische Makulopathie</b>	Laserkoagulation

**Tabelle 7: Behandlung der diabetischen Makulopathie**

Für Ödeme im Bereich der Makula wird mittlerweile empfohlen mit anti-VEGF Therapie zu beginnen und nur bei Bedarf Laser nach den ersten Injektionen anzuwenden [28, 31]. Für Ödeme außerhalb der Makula ist die Lasertherapie nach wie vor indiziert [28].

### **1.3.5 Wirkweise und Rolle der Lasertherapie und der VEGF-Inhibitoren insbesondere Ranibizumab in der Behandlung des diabetischen Makulaödems**

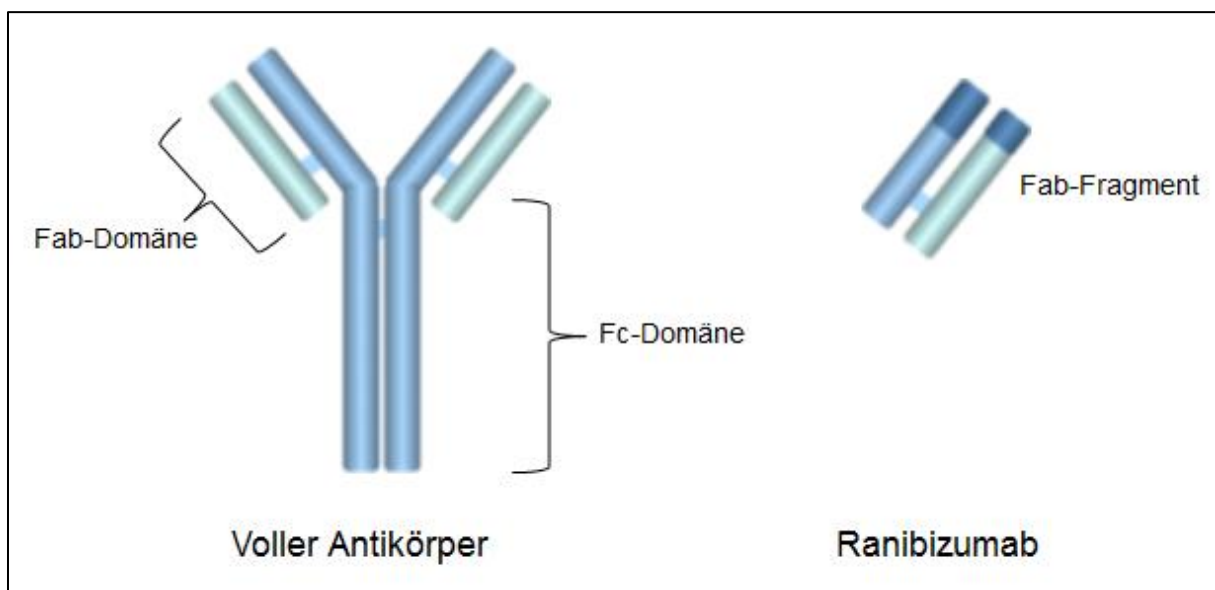
In der klinischen Studie, die in dieser Dissertation beschrieben wird, werden sowohl Laserphotokoagulation als auch anti-VEGF Therapie mit Ranibizumab angewendet. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Wirkung beider Therapien.

Die erste lokale Therapie, die auf der Netzhaut angewendet wurde, war die Laserphotokoagulation. In den 1980er Jahren erzielte man damit zum ersten Mal positive Ergebnisse bei der Behandlung des DMÖ. Mit der Laserphotokoagulation konnte die Wahrscheinlichkeit eines Visusverlustes um die Hälfte reduziert werden [32]. Neuere Arbeiten zeigen, dass die gitterförmig applizierte Laserkoagulation (in der ophthalmologischen Literatur als *grid* bezeichnet), bei diffusem DMÖ

Reparaturmechanismen anregt und über mehrere Wochen hinweg retinale Strukturen wiederherstellen und Flüssigkeitsansammlungen reduzieren kann. Vor allem die äußere Grenzmembran scheint gut auf eine Laserbehandlung anzusprechen und kann regeneriert werden. Das Ausmaß der Heilung scheint von der absorbierten Laserenergie abzuhängen [33]. Die Migration von Gliazellen und Makrophagen wurde nach Laserkoagulation beobachtet, wodurch womöglich die Wiederherstellung der Netzhautfunktion erreicht wird [34]. Auch die sogenannte fokale Laserkoagulation, die zielgerichtet auf Mikroaneurysmen appliziert wird, zeigt nach geringer Narbenbildung eine Reduktion der Leckage und eine Wiederherstellung von zuvor gestörten Netzhautstrukturen [35].

VEGF spielt bei der Entstehung des DMÖ eine essentielle Rolle, was in Kapitel 1.4.4 noch ausführlich beschrieben wird. Die Hemmung von VEGF durch verschiedene Substanzen, wurde in zahlreichen präklinischen [3, 36-40] und klinischen Studien [31, 41-51] getestet und stellt für einen Großteil der Patienten mit Visusbeeinträchtigung durch DMÖ eine wirksame Therapie dar, die zum Erhalt und teilweise auch zur Verbesserung des Visus führen kann.

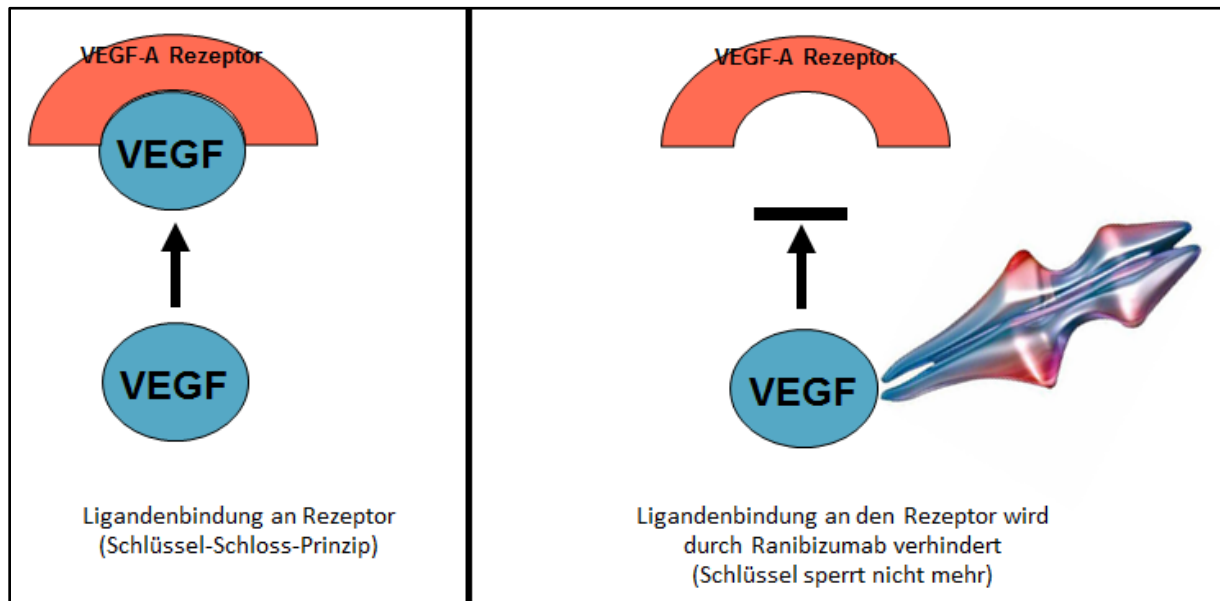
Ranibizumab ist der erste für die Behandlung einer Visusbeeinträchtigung auf Grund eines diabetischen Makulaödems zugelassene Wirkstoff. Ranibizumab ist ein humanisiertes monoklonales Fab-Antikörper Fragment, das mit rekombinanter DNA-Technologie aus *Escherichia coli* hergestellt wird (Fachinformation Lucentis®, Stand Februar 2014; humanisiert: ersetzen von *E. Coli* Regionen des Fragments durch baugleiche Regionen des Menschen um Abstoßungsreaktionen körperfremder Anteile zu vermeiden). In Abbildung 15 ist Ranibizumab im Vergleich zu einem vollen Antikörper dargestellt.



**Abbildung 15:** Bei einem vollen Antikörper sind 2 Fab Domänen an eine Fc Domäne gebunden. Ranibizumab besitzt keine Fc Domäne sondern lediglich ein Fab-Fragment

Ranibizumab hemmt gezielt VEGF-A, das somit nicht mehr für die Rezeptorbindung zur Verfügung steht (siehe Abbildung 16). Mehr Details zu VEGF, seinen Splicingvarianten und der Rezeptorwirkung folgen in Kapitel 1.4.4.





**Abbildung 16: Schematische Darstellung der Bindung von VEGF an den VEGF-A Rezeptor in der linken Bildhälfte. In der rechten Bildhälfte wird die Bindung von Ranibizumab an ein VEGF-Molekül gezeigt, dass dadurch nicht mehr an den VEGF-A Rezeptor binden kann.**

Off-label (außerhalb des Zulassungsbereichs), wird außerdem der volle Antikörper Bevacizumab eingesetzt, der als Chemotherapeutikum bei diversen Krebserkrankungen zugelassen ist. Bevacizumab ist ein Antikörper, der VEGF-A hemmt. Die Datenlage aus randomisierten, verblindeten klinischen Studien zum Einsatz von Bevacizumab bei Patienten mit DMÖ ist weniger umfangreich als von Ranibizumab. Die einzigen prospektiven DMÖ Studien sind die Bolt Studie mit 80 Patienten und eine DRCR.net Studie [50, 52, 53].

Seit kurzem (September 2014) ist Aflibercept für die Behandlung eines DMÖ zugelassen. Auch für die Behandlung von feuchter AMD (altersabhängige Makuladegeneration) oder Makulaödem auf Grund eines Zentralvenenverschluss ist Aflibercept zugelassen. Aflibercept stellt ein Fusionsprotein aus dem löslichen VEGF-Rezeptor und einem VEGF-Antikörper dar (Fachinformation Eylea® 40 mg/ml). Die Ergebnisse der Phase II und III Studien weisen darauf hin, dass auch diese Substanz wirksam ist [54, 55], jedoch wurde in den Zulassungsstudien nicht gegen die Ranibizumab sondern Lasertherapie verglichen.

Neben den Anti-VEGF Medikamenten ist mittlerweile das Steroid-Insert Iluvien® (Wirkstoff Fluocinolon) für therapierefraktäre Patienten zugelassen. In den Zulassungsstudien [56-58] wurde die Wirksamkeit gezeigt, es wurde wegen der hohen Nebenwirkungsrate aber nur als Second-line Therapie zugelassen. Das Insert ist 1-3 Jahre im Auge wirksam, aber nicht biologisch abbaubar.

Ein weiteres Steroid-Insert (Wirkstoff 700µg Dexamethason) ist unter dem Handelsnamen Ozurdex® seit Mitte 2014 für die Behandlung des DMÖ zugelassen. Entsprechend der Ergebnisse der Zulassungsstudie [59] wurde der Einsatz des Inserts für Patienten empfohlen, die „einer Sehbeeinträchtigung aufgrund eines diabetischen Makulaödems (DMÖ) [unterliegen], die pseudophak sind oder auf eine Therapie mit Nicht- Kortikosteroiden unzureichend ansprechen oder bei denen diese als unpassend angesehen wird“ (Ozurdex Fachinformation, Stand August 2014). Die MEAD Studie [59] zeigte, dass nach 3 Jahren Beobachtungsdauer der Anteil an Patienten mit einem Buchstabengewinn von mehr als 15 Buchstaben signifikant höher war als mit Scheinbehandlung (22,2 % mit 4,1 Behandlungen á 700 µg vs. 12,0 %,  $p \leq 0,018$ ).

Eine Übersicht der Studienergebnisse ist in Kapitel 4.1 zu finden, in der auch die Resultate der RELATION Studie im Vergleich dargestellt werden.

Das Sicherheitsprofil von Ranibizumab ist im Kapitel 8.3.1 im Anhang beschrieben. Vor allem ophthalmologische Nebenwirkungen wurden berichtet, aber auch systemische Nebenwirkungen wie z.B. Kopfschmerzen, Nasopharyngitis oder Arthralgie.

Noch ist unklar, was die beste Therapieoption ist und wie man die Behandlungsfrequenz bei DMÖ Patienten optimal gestalten kann. Außerdem bleibt zu untersuchen, ob es Patientensubgruppen gibt, die besonders vom Einsatz eines bestimmten Medikaments profitieren.

Die optimale Therapie hinsichtlich Wiederbehandlungskriterien und Einsatz der Lasertherapie ist Bestandteil der Untersuchungen, um die es in dieser Dissertation geht. Zum Zeitpunkt der Konzeption waren dahingehend noch viele Fragen offen.

Nach dem Überblick zu den klinischen Aspekten der diabetischen Retinopathie, folgen nun die pathophysiologischen Mechanismen in der Retina, die deutlich machen, warum Untersuchungen von Medikamenten und Biomarkern in diesem Bereich interessante neue Erkenntnisse liefern können.

## **1.4 Pathobiologie des Diabetes mellitus und Entstehung des Makulaödems**

### **1.4.1 Diabetesbedingte Pathogenese und deren Folgen**

Um zu verstehen wie sich DR und DMÖ entwickeln, wird in diesem Kapitel beschrieben, welche Mechanismen allen Diabeteskomplikationen zu Grunde liegen. Brownlee hat die Veränderungen bei Diabetes Mellitus auf Proteinebene zusammengefasst und weitere Mechanismen postuliert [60, 61].

Es gibt besonders anfällige Zelltypen für die bei Diabetes Mellitus vorliegende Stoffwechsellage. Das sind allen voran kapillare Endothelzellen in der Retina, Mesangialzellen in den Nierenglomeruli und im peripheren Nervensystem Neuronen und Schwanzellen.

Der übergeordnete Prozess, der besonders in diesen Zellen zu Komplikationen führt, ist die Überproduktion von Superoxid und reaktiven Sauerstoffspezies (=ROS: reactive Oxygen species) in der Elektronentransportkette [62]. Die bei Hyperglykämie vermehrt in Mitochondrien gebildeten ROS verursachen DNA-Schäden (Strangbrüche) im Zellkern. Eine reduzierte Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist unter anderem die Folge. GAPDH steht nur mehr bedingt für seine eigentliche Rolle (Abbau von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat in der Glykolyse) zur Verfügung. Es kommt zum Rückstau von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und weiterer Glucose-Abbauprodukte, die in den vorherigen Schritten der Glykolyse entstehen. Dabei werden die vier Hauptsignalwege aktiviert, die für die negativen Folgen der Hyperglykämie verantwortlich gemacht werden. Das sind

1. der Polyol Signalweg
2. der Hexosamin Signalweg
3. der Proteinkinase Signalweg
4. der AGE Signalweg

Diese vier Hauptsignalwege der intrazellulären Hyperglykämie haben folgende Auswirkungen auf die Mikrovascularisation [60]:

1. Der Polyolweg [63, 64]: Die kritische Folge der Hyperglykämie im Polyol Weg ist, dass nicht mehr ausreichend reduziertes Gluthathion als Antioxidans zur Verfügung steht und somit die Empfindlichkeit gegenüber oxydativem Stress steigt.
2. Der Hexosamin Stoffwechsel [60]: Bei erhöhter Glucosekonzentration wird über die Glykolyse vermehrt N-Acetyl-Glucosamin gebildet, das auf Serin oder Threoninreste übertragen wird. So veränderte Proteine führen zu einer modulierten Genexpression. Dadurch werden vermehrt Faktoren wie Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) oder Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) gebildet werden [65-68], deren Auswirkungen im nachfolgenden Punkt 3 beschrieben werden.
3. Der Proteinkinase Signalweg: Auf Grund der Hyperglykämie im Zellinneren wird vermehrt DAG (Diacylglycerol) gebildet. Dieser Cofaktor aktiviert die klassischen Isoformen der Proteinkinase C (PKC  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\alpha$ ). PKC nimmt Einfluss auf die Genexpression, wobei physiologische Vorgänge gehemmt und pathophysiologische Vorgänge induziert werden. Zu diesen pathophysiologischen Vorgängen gehören:
  - Hemmung der physiologischen Bildung von vasodilatierendem NO durch die Synthese eNOS [69]
  - vermehrte Bildung von vasokonstriktorisch wirksamen Endothelin-1 [70]
  - übermäßige Ausschüttung von TGF-  $\beta$ , das zum Verschluss von Kapillaren führt und gesteigerte Produktion von PAI-1, das Gefäßverschlüsse induziert [71]
  - erhöhte Konzentration von VEGF (mehr zu den Folgen in den Kapiteln 1.4.3 und 1.4.4) [72]
  - Vermehrte Bildung von NF- $\kappa$ B, was die Expression proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat [73]
  - Übermäßige Ausschüttung von NAD(P)H Oxidasen, wodurch noch mehr der am Anfang des Kapitels erwähnten ROS gebildet werden [74]
4. Der AGE Stoffwechsel: vermehrtes Glukoseaufkommen führt zu Bildung von AGE (Advanced Glucation Endproduct) Vorläufern. Diese stören Zellen in vielerlei Hinsicht, denn es kommt zu
  - Modifikation von Proteinen, die an der Gentranskription beteiligt sind [75, 76]
  - Veränderung von extrazellulären Matrixproteinen, wodurch sich Signalwege zwischen Matrix und Zelle ändern, Fehlfunktionen der Zelle hervorgerufen werden [77, 78] und u.a. Integrine (Adhäsionsmoleküle) [79] ausgeschüttet werden
  - Modifikation von Proteinen, die im Blut zirkulieren, wie z.B. Albumin, die dadurch an AGE Rezeptoren auf Zellen (z.B. Macrophagen) binden und diese aktivieren. Die Aktivierung führt zur Expression inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren [79-82] (mehr zu den Auswirkungen auf die Retina in Kapitel 1.4.3).
  - Quervernetzung von Membranproteinen, was zu Verdickung, verringerter Dichte und Leckage der Basalmembran führt [83-85] (mehr zu den Auswirkungen auf die Retina in Abschnitt 1.4.3).

Diese Mechanismen sind verantwortlich für pathobiologische Veränderungen bei Diabetes mellitus und haben Auswirkungen auf Gefäßintegrität und Bildung von Proteinen wie Zytokine und Integrine. Die Bedeutung dieser Mechanismen speziell für die Zellen der Retina wird in Kapitel 1.4.3 besprochen.

Zuvor ist es aber erforderlich zu beschreiben, warum retinale Zellen so empfindlich auf Hyperglykämie reagieren.

### **1.4.2 Anfälligkeit der Retina gegenüber Hyperglykämie und Insulin**

Aufgrund Ihrer besonderen Stoffwechselsituation sind Endothelzellen der Netzhautkapillaren anfälliger gegenüber Hyperglykämie [60]. Sie können den Glukosetransport in die Zelle nicht regulieren und unterliegen bei Diabetes Mellitus folglich hohen intrazellulären Glukosekonzentrationen [86, 87]. Die in 1.4.1 gelisteten negativen Folgen der Hyperglykämie stellen sich also rasch ein.

Folgende weitere Faktoren machen die Retinazellen anfällig für Hyperglykämie:

- Hoher Energieverbrauch der Axone um das Membranpotential aufrecht zu erhalten [88]
- Geringe Dichte an Blutgefäßen [89, 90]
- Energiegewinnung der nahe am Glaskörper liegenden Zellschichten aus der weniger effizienten Glykolyse [91].

Dieser hohe Energieverbrauch bei geringer Durchblutung ist ein weiterer Faktor für die Anfälligkeit der Retina bei Diabetes Mellitus [4]. Denn durch die Diabetes mellitus bedingte Unterversorgung können die genannten Mechanismen schnell gestört werden.

Darüber hinaus hat der beeinträchtigte Insulinstoffwechsel bei Diabetes mellitus negative Auswirkungen auf die Retina. Unter physiologischen Bedingungen sind Insulinrezeptoren der Netzhaut stark konstitutiv aktiv, was auf Grund des hohen Energiebedarfs für die Retinafunktion essentiell ist [92]. Bei Diabetes mellitus erhöht vermehrt vorliegendes Insulin die Basalaktivität der Insulinrezeptoren. Bei experimentellen Diabetesmodellen wurde gezeigt, dass darauf ein Verlust der konstitutiven Aktivität folgt [93-95]. Die Zellen können nicht mehr genügend Glucose aufnehmen woraufhin Neuronen, Photorezeptoren und Gefäßzellen zu Grunde gehen [95-98].

Zusammenfassend ist für die Pathogenese von diabetischer Retinopathie und DMÖ die Sensibilität der Retina bezüglich Glucoseüberangebot und dem gestörtem Insulinstoffwechsel von außergewöhnlicher Bedeutung.

### **1.4.3 Bildung des diabetischen Makulaödems**

Nach der Besprechung der pathobiologischen Mechanismen der diabetesbedingten Stoffwechselstörungen in Kapitel 1.4.1 und der Anfälligkeit der retinalen Zellen gegenüber Hyperglykämie in Kapitel 1.4.2, folgen nun die Schritte, die zur Bildung des DMÖ führen.

Der ausschlaggebende Prozess in der Entstehung des DMÖ ist der Zusammenbruch der inneren Blut Retina Schranke [20, 62, 99-101]. Die genauen Mechanismen, die zum Zusammenbruch führen, sind noch nicht endgültig geklärt [102], aber die folgenden Theorien sind postuliert: Durch Hyperglykämie werden Neuronen und Gliazellen beeinträchtigt und gehen zu Grunde, noch bevor es zu strukturellen Veränderungen der Blut-Retina-Schranke kommt [7]. AGEs beeinträchtigen die Funktion der Gliazellen und VEGF-Produktion wird induziert [103]. Morphologische Veränderungen wie Migration und Untergang von Perizyten werden in frühen Diabetesstadien beobachtet. In Folge verlieren die Kapillaren ihre Stabilität und sowohl Aussackungen als auch Microaneurysmen entstehen. Dieser Vorgang scheint durch AGEs ausgelöst zu werden [7]. Letztendlich folgt der Untergang der tight-junctions zwischen den Endothelzellen auf Grund der durch AGEs veränderten Matrixproteine. Auch die Endothelzellen gehen zu Grunde wegen der im Proteinkinase-Weg ausgeschütteten Entzündungsmediatoren (s. Kapitel 1.4.4) [6]. Die Blut-Retina-Schranke bricht zusammen und Flüssigkeit tritt aus [7].

Vermehrtes Anheften von Leukozyten an die Endothelzellen, das durch ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) induziert wird (AGE vermittelt) [104], scheint eine essentielle Rolle beim Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke zu spielen [105]. Die auf Grund der angehefteten Leukozyten verdickte Basalmembran und das verkleinerte Kapillarlumen verändern die Fließeigenschaften des Blutes. Es kommt zu vermehrter Ausschüttung von Entzündungsmediatoren [106], was die Apoptose von Perizyten und Endothelzellen begünstigt [7]. Das führt wie bereits beschrieben, zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schrank und zur Permeabilität und Minder-/Nichtperfusion von Kapillaren [107].

Bei einigen dieser Schritte, die zur Bildung des DMÖ führen, spielt VEGF eine essentielle Rolle. Daher stellt die anti-VEGF Therapie, wie bereits in Kapitel 1.3.4 und 1.3.5 besprochen eine wirksame Therapie gegen das DMÖ dar. Im folgenden Kapitel wird VEGF und seine Rolle bei DMÖ diskutiert.

#### **1.4.4 Rolle des VEGF in der Entwicklung der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems**

VEGF wird als einer der wichtigsten Faktoren in der Angiogenese von Blutgefäßen postuliert [108]. Bei der Bildung des diabetischen Makulaödems steht jedoch der Einfluss auf die Gefäßwandintegrität im Vordergrund, was auch erklärt, dass 1983 VEGF zum ersten Mal als *Vascular Permeability Faktor* beschrieben [109] wurde.

Es gibt fünf verschiedene humane VEGF Isomere (VEGF A bis D und PLGF – placental growth factor). Von VEGF-A gibt es 5 Splicing-Varianten: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub> und VEGF<sub>206</sub>. VEGF<sub>165</sub> ist die häufigste Isoform von VEGF-A.

Die Isomere binden an drei VEGF-Rezeptoren (VEGFR):

- an VEGFR-1 bindet: VEGF-A, VEGF-B, PLGF
- an VEGFR-2 bindet: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D
- an VEGFR-3 bindet: VEGF-C, VEGF-D [108, 110-112]

An Neuropilin-Rezeptoren 1 und 2, welche die VEGFR-Wirkungen verstärken, bindet die Splicingvariante VEGF-A<sub>165</sub> [112].

Alle VEGF-Rezeptoren haben eine extrazelluläre, Liganden-bindende Domäne bestehend aus sechs Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Loops. Bei den membranständigen VEGF-Rezeptoren folgt eine transmembranäre Domäne bestehend aus einer juxtamembranständige-Domäne, einer Split-Tyrosinkinase Domäne und dem C-terminalen Ende. VEGF-Rezeptoren dimerisieren nach Ligand-Bindung. Neben den membranständigen VEGF-Rezeptoren, gibt es außerdem nicht-membranständige, lösliche VEGF-Rezeptoren (sVEGFR) [113].

VEGFR-1 bei Mäusen ist auch unter der Bezeichnung Flt-1 (Fms-like Tyrosinekinase) bekannt: Liganden binden an Loop 2 bei VEGFR-1 wobei VEGF-A mit deutlich höherer Affinität an VEGFR-1 als an VEGFR-2 bindet (Dissoziationskonstante  $K_d = 15 \text{ pM}$  vs.  $750 \text{ pM}$ ) [113, 114]. Nach Ligandbindung werden Tyrosinkinasen phosphoryliert, wodurch unter anderem Signalkaskaden wie PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ), PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase), MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase) und ERK (extrazellulär-Signal-regulierte Kinase) aktiviert werden [113].

VEGFR-2, auch KDR (kinase insert domain Rezeptor) beim Menschen oder Flk-1 (Fetal liver Kinase) bei Mäusen genannt präsentieren mit den Ig-Loops zwei und drei die Ligand-bindende Domäne. Die der Ligandenbindung folgende Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert viele, komplexe intrazelluläre Signalwege wie die RAS/RAF-Kaskade (RAS: Ratten-Sarkomvirus; RAF: rapidly accelerated

fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma), die p38MAPK-Kaskade oder VE-Cadherin (vascular endothelial-Cadherin) Phosphorylierung [113].

Die Ligandbindung an VEGF-R3 und darauffolgende Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors führt unter anderem zur Aktivierung von ERK1/2, SHC (Src-sarcoma- homology and collagen homology) und JNK (c-Jun N-terminal Kinase) [113].

Die konkreten Auswirkungen der Ligand-Bindung an die Rezeptorwirkung werden weiter unten im Kapitel beschreiben. Zuerst einmal wieder zurück zur Rolle des VEGF bei Retinopathie: VEGF wird in der Retina vom RPE, den Neuronen, Gliazellen, Endothelzellen, Ganglienzellen und Müllerzellen produziert [108, 115]. Die Gefäßendothelzellen werden am stärksten von VEGF beeinflusst [108]. VEGF-A stellt das wichtigste Isomer bezüglich Angiogenese und Permeabilität dar [112].

Der Hauptauslöser für die VEGF Synthese ist Hypoxie [108, 116]. Bei Hypoxie wird HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$ ) nicht mehr ausreichend abgebaut. Der Überschuss führt zur Bindung von HIF-1 $\alpha$  an das VEGF Gen, wodurch die VEGF Synthese induziert wird. Darüber wird die VEGF Synthese auch von inflammatorischen Faktoren angeregt wie: TGF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , Epidermal Growth Factor, ILGF, IL-6, PKC- $\beta$ , PDGF, Keratinozyten Growth Factor, FGF [117] (TGF: transforming growth factor, IL: Interleukin, ILGF: insulin like growth factor, PKC: phosphokinase C, PDGF: platelet derived growth factor, FGF: fibroblast growth factor).

Stewart hat in seinem Review die Auswirkungen von pathologisch gebildetem VEGF zusammengefasst [108].

Die Bindung von VEGF an den VEGFR-1, der eine schwache Tyrosinkinase Aktivität besitzt, führt zur Freisetzung von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, zur Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen und zur Induktion von Matrix Metalloproteinasen. Da dies bisher lediglich für Tumor, Lungen- und Leberendothelzellen beschrieben wurde, ist die Auswirkung der VEGF Bindung an den VEGFR-1 bei diabetischer Retinopathie nicht geklärt [118-120], obwohl bewiesen ist, dass sowohl VEGFR-1 als auch 2 im Tiermodell hochreguliert werden. Die Aktivierung von VEGFR-1 alleine scheint zumindest im Zellmodell nicht auszureichen um eine Schrankenstörung zu initiieren [121], doch gibt es Hinweise, dass VEGFR-1 am ischämiebedingten Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke beteiligt ist [122]. Eine weitere Wirkung der VEGF-R1 Aktivierung, die möglicherweise bei DR eine Rolle spielt, könnte die Regulation der Angiogenese sein [123].

Im Gegensatz zur weitgehend unklaren Rolle von VEGFR-1 bei der Genese von DR und DMÖ, ist klar belegt, welche Auswirkungen die Bindung von VEGF an den VEGFR-2 hervorruft. Sie führt zu:

- Angiogenese [124], was sich bei DR in proliferativer diabetischer Retinopathie zeigt
- Vasodilatation durch NO-Ausschüttung [125], wodurch die Fließeigenschaften des Blutes verändert werden und negative Vorgänge wie Leukozytenadhäsion begünstigt werden
- Phosphorylierung der tight-junction Proteine zwischen den Endothelzellen [126, 127], die über Fenestrierung der Zellen [128] zum Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke führt [7, 100, 127]
- Bildung von ICAM-1 was die in Kapitel 1.4.3 beschriebenen Folgen hat [104]
- Überleben von Endothelzellen [129]

Die Bindung von VEGF an VEGFR-3 beeinflusst Proliferation, Migration, Zellüberleben und Angiogenese vor allem bei lymphatischen Endothelzellen [112], was bei DR keine Rolle spielt.

Zusammengefasst werden pathologische VEGF Mengen bereits in frühen Diabetesstadien auf Grund des Gliazell Untergangs produziert, wie bereits in Kapitel 1.4.3 beschrieben. Das hat Auswirkungen

auf die tight-junctions und somit auf die Integrität der Blut-Retina-Schranke. Die darauf folgende Unterversorgung und Hypoxie führt zur weiteren VEGF-Bildung, wodurch immer mehr Kapillaren betroffen sind.

Neben VEGF wurden in den letzten beiden Kapiteln auch weitere Biomarker genannt, die bei der Entstehung von Komplikationen bei DM und bei der DMÖ Bildung eine Rolle spielen. Im nun folgenden Kapitel ist daher zusammengefasst, wieso einzelne Biomarker für die Untersuchung im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgewählt wurden.

### 1.4.5 Rationale zur Auswahl der Biomarker

Neben der Untersuchung der klinischen Parameter ist ein Bestandteil dieser Dissertation die Untersuchung von Biomarkern bei Patienten mit DMÖ und weiteren Erkrankungen, die in Kapitel 2.3 beschrieben werden.

In Tabelle 8 ist zusammengefasst welche Biomarker ausgewählt wurden und warum diese für eine nähere Untersuchung interessant sind.

Biomarker	
<b>IL-8 (CXCL-2)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ist an Angiogenese beteiligt [130], welche über Bindung an CXCR2 vermittelt wird [131]</li> <li>• Beeinflusst Matrix Metalloproteasen, was bei der Permeabilität der Gefäße beim DMÖ eine Rolle spielen kann [132]</li> <li>• IL-8 war im Glaskörper bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit aktiver DR erhöht [133]</li> <li>• Gesteigerte Serum Konzentration von IL-8 wurde mit der Häufigkeit des Auftretens von Typ 2 DM (Diabetes mellitus) in Verbindung gebracht [134]</li> </ul>
<b>IL-10</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemmt Bildung von IL-6, IL-8 (CXCL-2) und ICAM-1 [135]</li> <li>• DM Patienten mit erhöhter IL-10 Konzentration haben ein niedrigeres Risiko für DR [136]</li> <li>• Keine Korrelation zwischen Serum IL-10 Konzentration und zentraler Retinadicke bei einem kleinem Patientenkollektiv festgestellt [137]</li> </ul>
<b>IL-17</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durch die Bindung von IL-17 an den IL-17 Rezeptor werden je nach Zielstruktur diverse Biomarker exprimiert (u.a. MCP-1, VEGF und ICAM-1) (siehe Review [138])</li> <li>• Unter dem Einfluss von IL-6 werden T-Helferzellen zu IL-17 produzierenden TH17-Zellen [139-141]</li> </ul>
<b>MCP-1 (CCL-2)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MCP: Monocyte chemotactic protein</li> <li>• Ist an Angiogenese beteiligt (60)</li> <li>• Induziert Matrix Metalloproteasen auf Oberfläche von Endothelzellen [132]</li> <li>• Wird von Endothelzellen produziert, wodurch Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten aktiviert werden [142, 143]</li> </ul>
<b>VEGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Siehe Kapitel 1.4.4 zur Rolle von VEGF in der Entstehung des DMÖ und der PDR</li> <li>• Konzentration von VEGF ist im Glaskörper bei DMÖ signifikant höher als bei nicht-Diabetikern und Diabetes-Patienten ohne DR; eine Korrelation mit der zentralen Foveadicke liegt vor [144]</li> </ul>

Biomarker	
<b>Apolipoproteine (Apo)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dyslipidämie wird mit einem erhöhten Risiko für DR in Zusammenhang gebracht [145]</li> <li>• Regulation des Fettstoffwechsels verringert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer DR [23, 146]</li> <li>• Apo A1, Apo B und das Verhältnis von Apo B /Apo A1 ist mit dem Auftreten einer DR und dem Schweregrad assoziiert [147, 148]</li> <li>• Patienten mit PDR haben höhere Apo B Konzentrationen im Vergleich zu Patienten ohne DR oder mit NPDR; bei PDR wurde eine niedrigere ApoA1 Konzentration festgestellt (inverser Zusammenhang) [149]</li> <li>• Es gibt Hinweise darauf, dass Apo E eine Rolle bei der Integrität der Extrazellulären Matrix spielt [150]</li> <li>• Ein Apo E Polymorphismus wurde als Risikofaktor für DMÖ postuliert [151]</li> </ul>
<b>sVCAM-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VCAM: vascular cell adhesion molecule</li> <li>• Spielt eine essenzielle Rolle bei der Anheftung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten [152, 153] an (mit TNF-<math>\alpha</math>) aktivierte Endothelzellen [154]</li> <li>• Scheint sowohl bei akuten als auch chronischen immunologischen Prozessen eine Rolle zu spielen [152]</li> <li>• AGEs bewirken eine vermehrte Bildung von VCAM-1 [155].</li> <li>• Serum Konzentration von sVCAM-1 (nicht signifikant) erhöht bei Diabetes Mellitus mit DR im Vergleich zu DM Patienten ohne DR [156]</li> <li>• Serum Konzentration von sVCAM-1 signifikant höher bei Patienten mit DR im Vergleich zu Patienten ohne DR [157]</li> <li>• Erhöhte Serum Konzentration bei Patienten mit insulinbedürftigem Typ 1 Diabetes Mellitus [158]</li> </ul>
<b>sICAM-1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ICAM-1 wird durch retinal ausgeschüttetes VEGF exprimiert (87).</li> <li>• Spielt wie VCAM-1 eine essenzielle Rolle bei der Anheftung von Lymphozyten an (mit TNF-<math>\alpha</math>) aktivierten Endothelzellen [154]</li> <li>• In diabetischer Retina stark exprimiert; kein Unterschied zwischen zwei verschiedenen Schweregraden der DR festgestellt [159]</li> <li>• Signifikant erhöht im Serum von Patienten mit Diabetes Mellitus im Vergleich zu Patienten ohne [156]</li> <li>• Erhöhte Serum Konzentration bei Patienten mit insulinbedürftigem Typ1 Diabetes Mellitus [158]</li> <li>• Erhöhte ICAM Konzentration im Serum von Kindern mit schlecht eingestelltem Typ 1 Diabetes Mellitus im Gegensatz zur Kontrollgruppe [160]</li> </ul>
<b>IL-6</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypoxie induziert die Bildung von IL-6 in Endothelzellen [161]</li> <li>• IL-6 steigert VEGF-Bildung in Zellkulturen [162]</li> <li>• IL-6 im Glaskörper signifikant höher bei DMÖ im Vergleich zu nicht Diabetikern und Patienten ohne DR; IL-6 signifikant höher bei hyperfluoreszentem (diffuses) DMÖ (FLA); IL-6 Konzentration im Glaskörper korreliert mit zentraler Retinadicke [144]</li> <li>• Korrelation zwischen Status des diabetischen Makulaödems (nicht vorhanden, fokal, diffus oder zystoid) und IL-6 Konzentration im Plasma (sofern eine posteriore Glaskörperabhebung vorlag) [163]</li> </ul>

**Tabelle 8: Übersicht über die Biomarker, die in dieser Arbeit untersucht werden**

Um einen Überblick über die Konzentration der Biomarker bei Gesunden, Patienten mit verschiedenen Diabetes Stadien und anderen Krankheiten zu erhalten, wurden die DMÖ-Proben mit verschiedenen anderen Kollektiven verglichen, welche in Kapitel 2.3 näher definiert sind.



## **2 Methodik**

Die Untersuchungen klinischer Parameter und Biomarker, die in dieser Dissertation besprochen werden, wurden im Rahmen der klinischen Prüfung RELATION (CRFB002DDE13) vorgenommen. Zustimmende Bewertungen aller Ethikkommissionen und des Paul-Ehrlich-Instituts sowie die Einverständniserklärungen der Patienten lagen vor Beginn der Untersuchungen vor.

Es folgt die Beschreibung der Rationale und des Designs der klinischen Prüfung RELATION anhand der Angaben im Prüfplan inklusive der Änderungen im Laufe der klinischen Prüfung (Amendment 1 und 3). In Kapitel 2.1.10 folgen die Untersuchungsmethoden, die angewandt wurden. Im Anschluss folgt ab 2.2 die Methodik der Biomarkeruntersuchungen.

### **2.1 CRFB002DDE13- RELATION: Eine klinische Prüfung zur Untersuchung von Ranibizumab in Kombination mit der Laserphotokoagulation beim diabetischen Makulaödem (DMÖ)**

#### **2.1.1 Hintergrund der klinischen Prüfung**

In den Phase II DMÖ-Studien RESOLVE und READ-2 hatte sich herausgestellt, dass Ranibizumab als intravitreale Injektion sowohl den Visus vieler Patienten stabilisieren und teilweise verbessern, sowie die durch das Makulaödem angeschwollene zentrale Retinadicke reduzieren konnte [42, 43].

Weitere Untersuchungen waren nötig um herauszufinden, ob Ranibizumab eine sichere Therapie darstellt und welches Therapieregime die besten Ergebnisse liefert. Während die Phase III Zulassungsstudie RESTORE noch lief [44], wurde die RELATION Studie geplant und gestartet, um weitere Daten zu Ranibizumab bei DMÖ liefern und neue Fragestellungen zu erörtern, die in Kapitel 2.1.2 beschrieben sind.

Die Lasertherapie war zum Zeitpunkt des Studienstarts die Therapie der Wahl und die Kombination der beiden Therapien Ranibizumab und Laser ließ vielversprechende Ergebnisse erwarten. Die Theorie war, dass die Ranibizumabinjektion ein relativ schnelles Ansprechen von Visus und Ödem hervorruft. Der Laser sollte dann langfristig die VEGF produzierenden Bereiche zerstören. Neben der langfristigen Stabilisierung des Visus durch die Kombination der Therapien war eine weitere Annahme, dass die kombinierte Behandlung zu weniger Wiederbehandlungen führt. Daher wurde als zu prüfende Therapie die Kombination von Ranibizumab mit Lasertherapie gewählt und verglichen mit der alleinigen Lasertherapie.

Eine weitere offene Frage war der Einfluss von Ranibizumab auf die PDR, wozu es zum Zeitpunkt des Starts der klinischen Prüfung noch keine Ergebnisse mit Ranibizumab gab. Daher waren Patienten mit DMÖ und zusätzlicher PDR als Studienpopulation erlaubt.

#### **2.1.2 Studiendesign und Zielparameter**

Die Studie wurde entworfen um bei Patienten mit einer Visusbeeinträchtigung auf Grund eines DMÖs die Wirksamkeit und Sicherheit von Ranibizumab in Kombination mit Lasertherapie gegenüber alleiniger Lasertherapie zu bestätigen. Dementsprechend wurde als primärer Endpunkt die Überlegenheit der kombinierten Therapie aus Ranibizumab (0,5 mg) und Lasertherapie im Vergleich zur alleinigen Lasertherapie in Bezug auf die mittlere Änderung der bestmöglich korrigierten Sehschärfe (BCVA- best corrected visual acuity) von Baseline zu Monat 12 gewählt (Bestimmung der

Sehschärfe s. Kapitel 2.1.11). Weitere Endpunkte umfassten die Untersuchung auf Überlegenheit der kombinierten Therapie gegenüber Lasermonotherapie nach 12 Monaten in Bezug auf

- Anzahl der Patienten mit Sehschärfe über 73 ETDRS\* Buchstaben
- Anzahl der Patienten mit einem Gewinn von 15 oder mehr ETDRS\* Buchstaben
- Anzahl der Patienten mit einer Verbesserung der BCVA
- Anzahl der Patienten mit einem Verlust von 15 oder mehr ETDRS\* Buchstaben.

\*ETDRS: *early treatment diabetic retinopathy study*, siehe Kapitel 2.1.11.

Darüber hinaus sollte der zeitliche Verlauf der BCVA, sowie die Änderung der zentralen Retinadicke (CRT) und anderer anatomischer Parameter betrachtet werden. Weitere Zielsetzungen waren die Änderung der Lebensqualität unter Behandlung festzustellen sowie Daten zur Sicherheit der Therapien zu erheben. Die Anzahl der Behandlungen in den einzelnen Gruppen sowie die Entwicklung des Visus in der Subgruppe der Patienten mit PDR waren Teil der geplanten Auswertung.

Als explorative Endpunkte wurden die Korrelation der Biomarkerexpression mit der CRT und die Biomarkerexpression zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht, welche einen der drei Schwerpunkte dieser Dissertation darstellt.

Die RELATION Studie war eine zweiarmige, 12-monatige, randomisierte, doppelblinde, multizentrische, aktiv kontrollierte klinische Prüfung mit 0,5 mg Ranibizumab. Geeignete Patienten wurden über die Prozeduren aufgeklärt und nach schriftlichem Einverständnis im Verhältnis 2:1 zur kombinierten Therapie aus Ranibizumab und Laser oder zur Laser Monotherapie mit begleitender Scheininjektion randomisiert. Das Durchführen einer Scheininjektion sorgte für eine adäquate Maskierung der Patienten bezüglich Behandlungszuordnung. Die Patientenzuordnung wird ab Kapitel 2.1.5 näher erläutert.

### **2.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Ein- und Ausschlusskriterien sind im Anhang 8.1 gelistet.

Kurz zusammengefasst waren Typ 1 oder 2 Diabetespatienten über 18 Jahren geeignet, bei denen ein visusbeeinträchtigendes diabetisches Makulaödem vorlag.

Ausgeschlossen waren Patienten mit okulären oder systemischen Krankheiten, welche die Ergebnisinterpretation beeinträchtigen konnten oder ein Risiko für Komplikationen darstellten.

### **2.1.4 Vorzeitiges Beenden der klinischen Prüfung gemäß Prüfplan**

Patienten mussten aus die Studie umgehend beenden, wenn die Einverständniserklärung zurückgezogen wurde oder eine Schwangerschaft vorlag. Darüber hinaus sollte ein Patient die Studie beenden, wenn der Prüfarzt der Meinung war, dass es dem Wohl des Patienten dient. Wegen Protokollverletzungen sollten Patienten nicht aus der Studie genommen werden, es sei denn es hätte ein signifikantes Sicherheitsrisiko für den Patienten bestanden. Patienten konnten jederzeit auf eigenen Wunsch die Studie verlassen. Als ausgeschieden galten Patienten, die von sich aus die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden wollten, die wiederholt nicht mehr zu Visiten erschienen, oder nicht mehr zu Follow-Up Untersuchungen antraten. Gründe für einen vorzeitigen Studienabbruch wurden im Fragebogen (=CRF: case report form) vermerkt. Vorzeitig ausgeschiedene Patienten wurden nicht durch Nachrückende ersetzt. Des Weiteren sollte die Studienbehandlung für Patienten abgebrochen werden, wenn eine Behandlung nötig wurde, die laut Studienprotokoll nicht zugelassen war.

### **2.1.5 Pseudonymisierung der Patienten**

Um Patienten pseudonymisieren zu können, wurde jedem Zentrum eine eigene Zentrumsnummer zugeordnet (z.B. 001, 002, 003, etc.). Nachdem ein Patient die Einverständniserklärung unterschrieben hatte, wurde ihm eine Patientenummer zugeordnet (z. B. 0001, 0002, 0003, etc.). Aus der Kombination aus Zentrums- und Patientenummer ergab sich die eindeutige Patientenummer (z.B. 0010001, 0010002, 0020001, 0040012, etc.). Nur dem Studienteam am Zentrum war die Zuordnung der Patientenummer zum Patienten bekannt.

### **2.1.6 Behandlung der Patienten und Verblindung von Studienpersonal und Patienten**

Um die Verblindung der Studie zu gewährleisten, wurden zwei Ärzteteams eingerichtet: ein *beurteilendes* Team und ein *behandelndes* Team. Anhand der erhobenen Befunde entschied das beurteilende Team, ob und welche Behandlung der Patient erhielt. Dieses Ärzteteam war gegenüber der Therapiezuordnung verblindet. Das behandelnde Ärzteteam führte die Behandlung durch und war somit nicht verblindet. Entschied das verblindete, beurteilende Team, dass eine Behandlung nötig war, erhielt das unverblindete, behandelnde Team mittels formeller Kommunikation die Anweisung ob und welche Behandlung anzuwenden sei. Das unverblindete Team führte die Behandlung entsprechend der Randomisierung durch. Entschied sich der *beurteilende* Arzt z.B. anhand der vorliegenden Befunde für eine kombinierte Therapie, der Patient war aber in die Laser Monotherapie randomisiert, so wurde vom unverblindeten Team eine Scheininjektion (Beschreibung in Abschnitt 2.1.7) und eine Lasertherapie durchgeführt. Die beiden Ärzteteams mussten sich während der gesamten Laufzeit der Studie an diese Gruppeneinteilung halten und durften sich nicht über die Patienten austauschen, um jede unbewusste oder bewusste Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden. Da beide Patientengruppen eine Lasertherapie erhielten, wurde die Laserkoagulation unverblindet durchgeführt.

Ranibizumab wurde vom Sponsor Novartis in Form von Vials zur Verfügung gestellt. Für die Scheininjektion wurden leere Vials eingesetzt. Patientenummer und Behandlungsdatum wurden auf dem Etikett der Vials eingetragen, nachdem die Behandlung/Scheinbehandlung durchgeführt wurde, damit der unverblindete Monitor die korrekte Medikationsgabe prüfen konnte. Die Medikation musste so aufbewahrt werden, dass das verblindete Personal keinen Zugang dazu hatte, so dass keine versehentliche Entblindung der Patienten und des verblindeten Personal stattfand (Monitor: vom Sponsor beauftragte Person, welche die CRF Eintragungen mit der Patientenakte abgleicht). Für die Laserphotokoagulation wurden die an den Zentren vorhandenen Lasergeräte verwendet.

Die Zuordnung der Patienten zur Therapie war randomisiert und darüber hinaus stratifiziert nach dem Vorhandensein/nicht Vorhandensein einer zusätzlichen PDR. Der verblindete Arzt benutzte für die Randomisierung eine Randomisierungsliste, von der immer die oberste Nummer verwendet wurde. Diese Nummer wurde in den CRF eingetragen und der Patient dann dem unverblindeten, behandelnden Arzt übergeben. Dieser suchte sich dann die sogenannte *Allocation Card* heraus, die der Randomisierungsnummer entspricht und entnahm der *Allocation Card* die Information welcher Studienbehandlung der Patient zugeordnet war. Randomliste und *Allocation Cards* wurden mit Hilfe eines validierten Systems erstellt, das Patienten automatisch und zufällig einer Behandlung zuteilt. *Allocation Cards* mussten für das verblindete Personal unzugänglich aufbewahrt werden.

Die Behandlung war in zwei Phasen aufgeteilt: der Initialphase und der Erhaltungsphase, die in Abbildung 17 schematisch dargestellt sind:

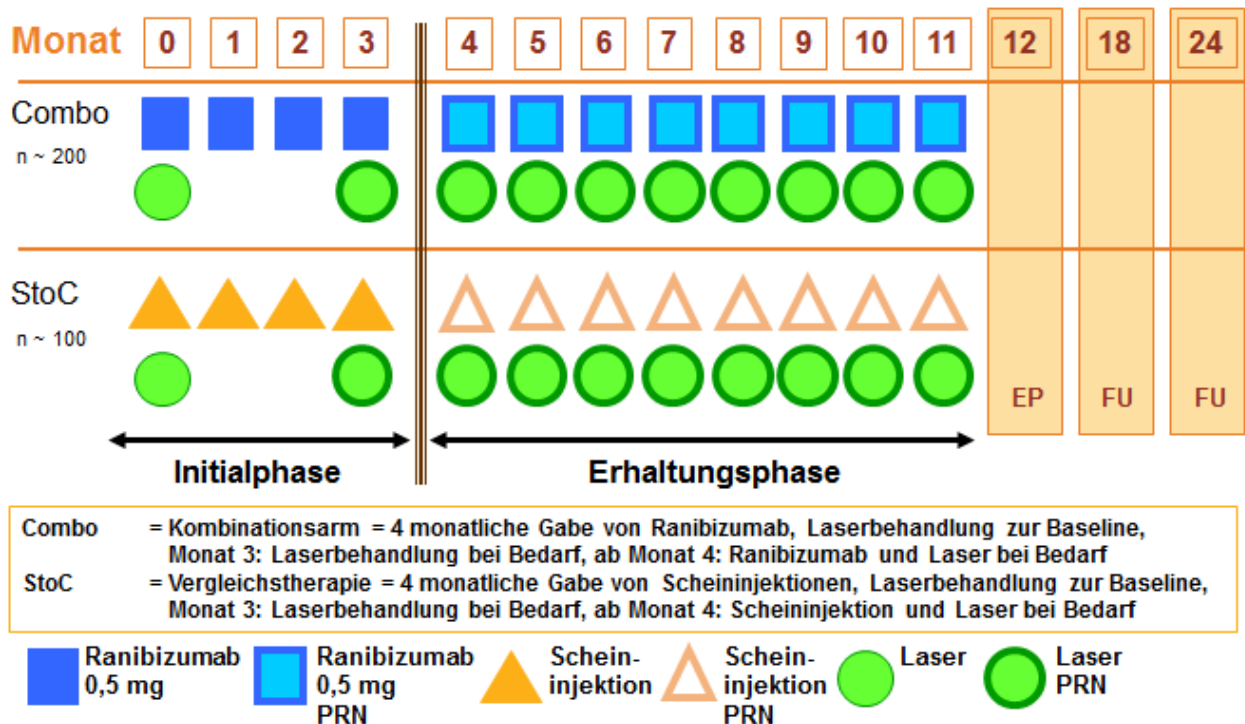


Abbildung 17: Studienkonzept der CRFB002DDE13; nach einer 4-monatigen Initialphase folgte die 8-monatige Erhaltungsphase. 12 Monate nach der Baselinevisite erfolgte der primäre Endpunkt. Follow-Up Visiten (FU) waren nach weiteren sechs und zwölf Monaten vorgesehen.

Drei bis sieben Tage nach der Screeningvisite folgte, falls der Patient für die Studie geeignet war, die Visite 2 (der Baselinevisite), an der mit der Behandlung begonnen wurde. Sowohl die Laserbehandlung als auch die Ranibizumab- bzw. Scheinbehandlung wurden gestartet. Danach sollten sich die Patienten monatlich am Prüfzentrum vorstellen. In der Initialphase folgten der Behandlung an Visite 2 weitere Pflicht-Ranibizumab- oder Scheininjektion an Visite 3, 4 und 5 (Monat 1, 2 und 3). Die Laserbehandlung konnte zur Visite 5 (Monat 3) wiederholt werden.

Mit Visite 6 (Monat 4) begann die Erhaltungsphase, bei der lediglich im Bedarfsfall die Behandlung wiederaufgenommen wurde. In der Erhaltungsphase erfolgte eine Wiederbehandlung, sobald eine Visusverschlechterung auf Grund des diabetischen Makulaödems auftrat, die zentrale Retinadicke um 20 % zunahm oder die zentrale Retinadicke über 250µm lag (Abbildung 18). Der verblindete Prüfarzt entschied also auf Grund des bestkorrigierten Visus und der im OCT (optische Kohärenztomographie, siehe 2.1.12) gemessenen Retinadicke, ob eine Wiederbehandlung notwendig war. Sofern der Patient nicht in den letzten drei Monaten gelasert worden war oder ein anderer Grund gegen den Lasereinsatz sprach (z.B. keine weiteren Laserherde möglich), sollte eine kombinierte Therapie von Ranibizumab und Laserphotokoagulation vorgenommen werden.

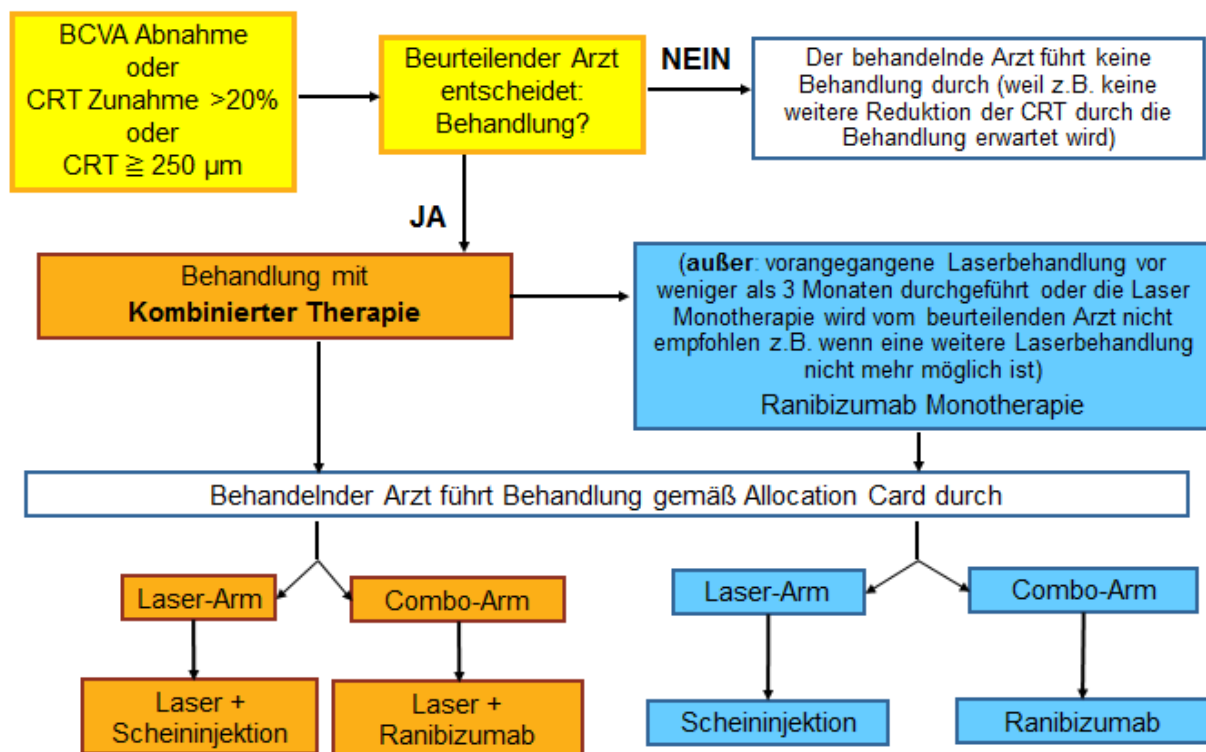


Abbildung 18: Wiederbehandlungsschema in der Erhaltungsphase; BCVA: best corrected visual acuity – bestkorrigierter Visus; CRT: central retinal thickness – zentrale Retinadicke

### 2.1.7 Durchführung der Behandlung

Die Applikation von Ranibizumab und Laserphotokoagulation sowie die Durchführung der Scheininjektion werden detailliert in Kapitel 8.2 beschrieben.

### 2.1.8 Weitere Behandlungsoptionen

Eine Veränderung der Dosis war in der Studie nicht erlaubt und eine Rescue-Therapie nicht vorgesehen. Wenn Prüfarzt oder Patient der Meinung waren, dass der Behandlungseffekt ungenügend war, sollte der Patient die Studie beenden, um dem Patienten eine alternative Behandlung zukommen zu lassen. Weitere Behandlungen, die in den letzten 28 Tagen vor Randomisierung stattfanden, wurden dokumentiert, sofern es sich nicht um Medikamente handelte, die im Rahmen der Studienroutine benutzt wurden (z.B. Fluoreszein, dilatierende Tropfen, topische Antibiotika oder Tropfanästhetika). Eine Reihe von Medikamenten durfte während der Studienlaufzeit nicht verwendet werden. Das waren vor allem Medikamente mit bekannter ophthalmotoxischer Wirkung wie Deferoxamin, Chloroquin/Hydroxychloroquin, Tamoxifen, Phenothiazine und Ethambutol sowie Glitazone. Falls eine solche Prüfplanverletzung auftrat, sollte im Einzelfall entschieden werden, wie der Patient weiterbehandelt wird.

Im Partnerauge war im Falle eines DMÖs die zu diesem Zeitpunkt adäquate Behandlung nach Einschätzung des Arztes erlaubt und sollten dokumentiert werden.

### 2.1.9 Weitere Vorgaben des Prüfplans

Für den Fall, dass eine Notfallentblindung nötig wurde standen Notfallbriefe zur Verfügung. Diese sollten nur nach genauer Abwägung aller Alternativen geöffnet werden. Der Grund für das Öffnen des Notfallbriefes musste mit Datum und Uhrzeit im CRF vermerkt werden. Außerdem wurde der Monitor benachrichtigt. Die Studienbehandlung wurde danach nicht weitergeführt.

Abweichungen vom vorgegebenen Behandlungs- oder Dosierschema wurden ebenso dokumentiert wie jede zusätzlich angewandte Therapie.

Es folgt ein Überblick aller Prozeduren, die im Rahmen der Studie vom Studienpersonal oder dem Patienten durchgeführt wurden (Tabelle 9).

Visitenummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Periode	SCN	Doppelblinde Behandlung														Follow up	
Studienmonat		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	18	24	
Studientag	-14 bis -3	1	30 ± 7	60 ± 7	90 ± 7	120 ± 7	150 ± 7	180 ± 7	210 ± 7	240 ± 7	270 ± 7	300 ± 7	330 ± 7	360 ± 7	540 ± 7	720 ± 7	
Prozedere																	
Einverständniserklärung	X																
Anamnese und vorherige Medikation	X																
Demographie	X																
Ein-/Ausschlusskriterien	X	X															
VFQ-25		X				X								X		X	
EQ-5D		X				X								X		X	
Vitalparameter	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Laboruntersuchung	X													X			
HbA1c	X													X		X	
Biomarker	X					X								X			
Bestmöglich korrigierter Visus	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Ophthalmologische Untersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Fundus Farbphotographie		X				X								X	X	X	
Fluoreszein Angiographie*		X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	X	(X)	X	
Optische Kohärenz Tomographie (OCT)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Intraokularer Druck		X				X								X			
Studien-behandlung Ranibizumab oder Scheininjektion**		X	X	X	X	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)				

Studienbehandlung Laser		X			(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)	(X)			
Begleitmedikation	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Unerwünschte Ereignisse		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Schwangerschaftstest***	X	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	[X]	X		
Studienabschluss																X
SCN = Screening-Visite * Fluoreszein Angiographie konnte nach Entscheidung des Prüfers bei jeder Visite durchgeführt werden (X) ** den Patienten sollte erläutert werden, dass jeweils 3 Tage vor und nach der Injektion gemäß Appendix 3 eine antimikrobielle Behandlung durchzuführen ist *** Bei Frauen im gebärfähigen Alter konnte nach Ermessen des Prüfarztes jeden Monat bei [X] optional ein Urin-Schwangerschaftstest durchgeführt werden																

**Tabelle 9: Im Prüfplan vorgeschriebene und optionale Untersuchungen**



### 2.1.10 Bestimmung der Endpunkte

In diesem Kapitel werden die Methoden zu Bestimmung der primären und sekundären Endpunkte besprochen. Die Beschreibung der Methodik zur Erhebung der Biomarkerkonzentrationen folgt in Kapitel 2.1.18.

Folgende Untersuchungen waren im Prüfplan vorgesehen:

- Bestkorrigierter Visus (BCVA) mit ETDRS-Tafeln im 4-Meter Abstand
- Optische Kohärenztomographie
- Farb-Fundusphotographie
- Fluoreszein Angiographie
- Sicherheitsparameter wie
  - Auftreten von unerwünschten Ereignissen
  - Vitalparameter
  - Laborwerte
  - Schwangerschaftstests
  - Ophthalmologische Standarduntersuchung
  - Messung des intraokularen Drucks
  - Gegebenenfalls weitere Untersuchungen (z.B. zur Perfusion des Sehnervenkopfs)
- Fragebögen zur Lebensqualität (EQ-5D, NEI VFQ-25)

Diese Untersuchungen wurden vom Studienpersonal am Zentrum durchgeführt bzw. im Fall der Fragebögen von den Patienten selbst.

### 2.1.11 Bestimmung der Sehschärfe

In klinischen Studien wird die Sehschärfe üblicherweise mit ETDRS-Tafeln von zertifizierten Visusprüfern bestimmt. ETDRS-Tafeln wurden in den Studien der ETDRS-Arbeitsgruppe etabliert und dienen dem standardisierten Test der Sehschärfe unabhängig vom Tester, sofern die Tester entsprechend erfahren oder geschult sind [164, 165].

Personal, das die Sehschärfebestimmung in der RELATION-Studie durchführte, musste eine Zertifizierung für diese Methode der Visusbestimmung vorweisen. Im Rahmen der CRFB002DDE13 wurde eine Person pro Zentrum zertifiziert, die dann falls nötig weiteres Personal am Zentrum schulte. Lag aus vorangegangenen Studien schon ein Zertifikat vor, so wurde dieses anerkannt ohne erneute Zertifizierung.

Zur Messung des ETDRS-Visus benötigt man ein standardisiert-beleuchtetes Kabinett auf einem Stativ, in das die modifizierten ETDRS Tafeln 1,2 und R eingelegt werden. Alternativ kann das Kabinett an einer Wand befestigt sein. Wichtig ist, dass sich die dritte Bestimmungsreihe von oben (0,8 logMar) in einem Abstand von 124,5 cm +/- 5,1 cm zum Boden befindet.

Spezielle Leuchtstoffröhren gewährleisten konstantes Licht. Die Röhren müssen vor dem ersten Test 96 Stunden ununterbrochen eingebrannt werden, bevor sie benutzt werden können und werden einmal im Jahr erneuert. Bei der Visusbestimmung sollten alle anderen Raumlichter wenn möglich ausgeschaltet sein (maximal 161 Lux; 1 Lux entspricht der Helligkeit einer Kerze aus 1 Meter Entfernung). Luxmeter zur Messung der Helligkeit wurden dafür verwendet. Vergleichbare Bedingungen sollten für jeden Test gewährleistet sein. In der CRFB002DDE13 wurden die Raumanforderungen von Novartis Monitoren überprüft.

Patienten nehmen beim Test in einem Abstand von 4 bzw. 1 Meter von der Testtafel entfernt Platz (s.unten).

Auf jeder ETDRS-Tafel befinden sich 14 Reihen *Sloan Buchstaben*. In jeder Reihe stehen Buchstaben mit vergleichbarem Schwierigkeitsgrad. Pro Reihe werden die Buchstaben proportional kleiner und der Buchstabenabstand innerhalb einer Reihe verringert sich proportional zur Buchstabengröße (Abbildung 19). Eine Zeile der Tafel gilt als erfolgreich gelesen, wenn mindestens 4 Buchstaben korrekt wiedergegeben werden.

Für die Bestimmung des Visus wird ein Visual Acuity Worksheet benutzt, von dem ein Ausschnitt in Abbildung 20 zu sehen ist. Kontaktlinsen sollen am Tag der Erhebung nicht getragen werden bzw. sollten herausgenommen und danach wenigstens 30 Minuten mit der Visusbestimmung gewartet werden.

Zuerst wird die Refraktion beider Augen mit der Visustafel R bestimmt. Dafür setzt der Patient eine spezielle Messbrille auf, in die Gläser mit unterschiedlicher Brechung eingesetzt werden. Danach wird ausgetestet mit welchen Refraktionsgläsern der Patient am besten sieht. In der RELATION Studie wurde bei allen Visiten im Studienauge und, wenn im Prüfplan vorgeschrieben auch vom Partnerauge, ausgehend vom Screening-Wert die Refraktion überprüft und gegebenenfalls neu eingestellt.

Nach der Refraktionsbestimmung behält der Patient die Brille mit der für ihn passenden Refraktion auf. Der Refraktionsbestimmung folgt die



Abbildung 19: Beispiel für eine ETDRS Tafel Quelle: [http://www.eyesfirst.eu/media/catalog/product/cache/2 /image/640x/040ec09b1e35df139433887a97daa66f /e/t/etdrs-tafeln-\\_r\\_-tafel-52037.jpg](http://www.eyesfirst.eu/media/catalog/product/cache/2/image/640x/040ec09b1e35df139433887a97daa66f/e/t/etdrs-tafeln-_r_-tafel-52037.jpg) Zugriff am 25.7.2013

SECTION I = 4 meter test

Row	Snellen Equivalent	Chart 1 Letters	No. correct at 4 meters
1	20/200	NCKZO	<input type="checkbox"/>
2	20/160	RHSDK	<input type="checkbox"/>
3	20/125	DOVHR	<input type="checkbox"/>
4	20/100	CZRHS	<input type="checkbox"/>
5	20/80	ONHRC	<input type="checkbox"/>
6	20/63	DKSNV	<input type="checkbox"/>

Abbildung 20: Ausschnitt aus dem Visual Acuity Worksheet der Tafel 1

BCVA-Bestimmung (BCVA=best corrected visual acuity) mit den Tafeln eins für das rechte und zwei für das linke Auge. Zuerst versucht der Patient auf der Tafel in vier Meter Entfernung von oben links (größte Buchstaben) nach unten rechts (kleinste Buchstaben) die Buchstaben korrekt vorzulesen. Alle richtig gelesenen Buchstaben werden auf einem VA-Worksheet (Abbildung 20) markiert und die Summe am Ende der Zeile notiert. Der Patient liest soweit, bis drei oder weniger Buchstaben korrekt erkannt werden. Danach wird der Test abgebrochen. Die Buchstaben der letzten gelesenen Zeile

werden noch zu den bereits korrekt gelesenen Buchstaben hinzugezählt und zu 30 addiert. Ein Patient kann also in 4 Meter Abstand wenigstens 34 bis hin zu 100 Buchstaben lesen.

Sollten auf der obersten Zeile der Tafel in vier Meter Abstand nur drei oder weniger Buchstaben erkannt werden, wird der Patient in einem Abstand von einem Meter zur Tafel positioniert. Bei dieser Entfernung können maximal 30 Buchstaben gelesen werden. Das sind die 30 Buchstaben, die bei der vier-Meter-Bestimmung automatisch dazu addiert werden.

Sollte es den Patienten nicht möglich sein in einem Meter Abstand Buchstaben zu identifizieren, testet man zunächst, ob der Patient noch die Anzahl der Finger benennen kann, die der Visusprüfer hochhält. Erkennt der Patient auch diese nicht mehr, wird getestet, ob eine Handbewegung registriert wird und schlimmstenfalls wird auf Lichtwahrnehmung mit einem Ophthalmoskop getestet.

In der RELATION Studie war die Bestimmung der Sehschärfe des Studienauges an jeder Visite vorgesehen, die Bestimmung am Partnerauge nur an den Visiten 1, 14, 15 und 16.

### **2.1.12 Bildgebende Befunde zur Bestimmung anatomischer Parameter**

Im Rahmen der Studie wurden drei verschiedene Methoden zur Erhebung bildgebender Befunde der Netzhaut angewandt: die Farb-Fundusphotographie (FP), die Fluoreszenzangiographie (FLA) und die Optische Kohärenztomographie (OCT). Anhand dieser Methoden konnten einer Reihe von anatomischen Parametern über die Studiendauer beurteilt werden.

Für alle Aufnahmen galt: Pro Patient sollte während der gesamten Studie immer dasselbe Gerät für die Aufnahmen genutzt werden damit die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Bilder erhalten bleibt. Neue Geräte sollten nur für neu rekrutierte Patienten genutzt werden, die dann auch über die gesamte Studiendauer nur mit diesem Gerät beobachtet werden.

Bei Aufnahmen des Augenhintergrunds waren dilatierte Pupillen vorgeschrieben. Alle Tests, für die ein nicht-dilatiertes Auge notwendig war (Visus, Fragebögen), mussten vorher abgeschlossen sein. Die Fundus- und OCT-Aufnahmen sollten vor der Fluoreszein-Untersuchung erhoben werden.

Die Auswertung der bildgebenden Befunde übernahm ein sogenanntes Reading Center. Ein Reading Center wertet Bildbefunde gemäß genau vergebenen Standards aus. Der Standard wird gewährleistet indem vor der Auswertung der Befunde eine einheitliche Vorgehensweise festgelegt wird und immer zwei unabhängige *Grader* die Bilder beurteilen. Sollte es eine Abweichung in den Befunden der zwei *Grader* geben, wird ein dritter *Grader* mit viel Erfahrung (*Senior Grader*) hinzugezogen. *Grader* sind dadurch qualifiziert, dass sie eine langjährige ophthalmologische Ausbildung mit einschlägiger Erfahrung im Bewerten von Aufnahmen des Augenhintergrundes haben.

In einem Reading Center Manual wurde die genaue Vorgehensweise der Bildanfertigung für das Zentrumspersonal beschrieben. Die exportierten und pseudonymisierten Bilder wurden per DVD an das Reading Center geschickt. Nicht pseudonymisierte Bilder wurden sofort gelöscht und nicht für die Auswertung verwendet.

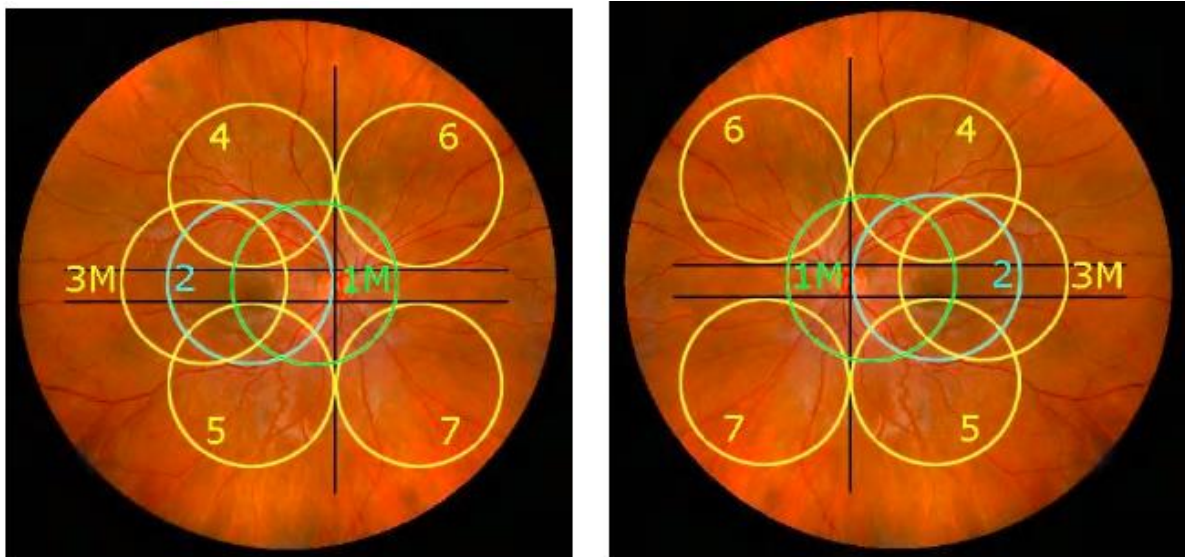
#### **2.1.12.1 Farb-Fundusphotographie (FP)**

Fundusaufnahmen sind Photographien der mit einer Spaltlampe beleuchteten Netzhaut. Diese waren in der RELATION Studie zum Zeitpunkt Baseline (Visite 2), Monat 4 (Visite 6), Monat 12 (Visite 14 bzw. Abschlussvisite), Monat 18 (Visite 15) und Monat 24 (Visite 16) im Prüfplan vorgeschrieben.

Falls zusätzliche Bilder gemacht wurden, sollten diese gesammelt und zusammen mit der nächsten vorgeschriebenen Visite ans Reading Center versendet werden.

Zuerst wurden Farb- Fundusreflexaufnahmen beider Augen angefertigt um eine eventuelle Medientrübung zu erfassen (Bild von Kanthus zu Kanthus, also zwischen dem einen und dem anderen Augenlidwinkel eines Auges).

Es folgten die Farbfundusaufnahmen beider Augen. Pro Auge wurden sieben Aufnahmen angefertigt, ausgehend von der Papille über die Makula bis zu den 4 peripheren Bildern (sogenannte modifizierte 7-Feld Aufnahme; Abbildung 21).



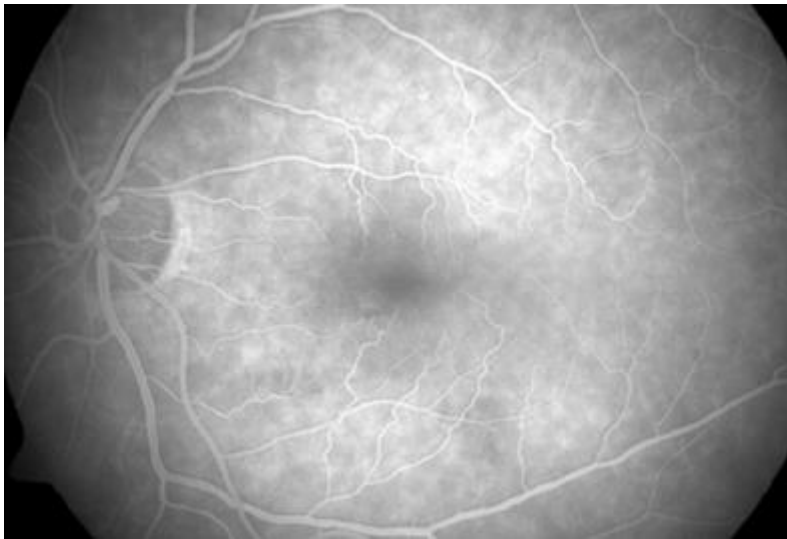
**Abbildung 21: Modifizierte 7-Feld-Aufnahme des linken (links) und rechten Auges (aus CIRCL-Manual, Version 1 vom 10.06.2010 angelehnt an Manuals des Wisconsin Reading Center <http://eyephoto.ophth.wisc.edu/photography/Photographers.html> , Zugriff 27.04.2015, mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Sandra Liakopoulos, Köln)**

Lagen Neovaskularisationen außerhalb der sieben abgebildeten Felder, konnte optional konnte ein achttes Feld oder mehrere Felder (8a, 8b, etc.) aufgenommen werden. Die Lage der Felder musste dokumentiert und ans Reading Center übermittelt werden.

Stereoaufnahmen wurden von beiden Augen der Felder 1M, 2 und 3M angefertigt und Rotfreiaufnahmen beider Augen vom zentralen Feld 2. Stereoaufnahmen werden angefertigt indem man zwei Bilder in einem leicht veränderten Winkel aufnimmt. Durch leichtes Schielen entsteht beim Betrachten der beiden Bilder nebeneinander ein drittes Bild, durch das man einen räumlichen Eindruck gewinnt. Mit Stereobildern der Retina kann man das Höhenprofil der Gewebsschichten erkennen.

Für die Befundung der diabetischen Retinopathie nach dem *ETDRS Severity Level* [166] werden die Fundusphotographien herangezogen. Außerdem wurden in der RELATION die Fundusphotos unterstützend zur Identifikation von Neovaskularisationen auf den FLA-Aufnahmen verwendet.

### 2.1.12.2 Fluoreszenzangiographie (FLA)



**Abbildung 22: FLA-Aufnahme einer gesunden Netzhaut. Mit freundlicher Genehmigung der Novartis Pharma GmbH.**

FLAs waren im Prüfplan für die Visiten 2, 6, 14, 15 und 16 vorgeschrieben. Darüber hinaus gemachte Bilder sollten ebenfalls an das Reading Center geschickt werden.

Vor Injektion des Farbstoffs wurden Rotfreiaufnahmen angefertigt, bei denen das rote Licht gefiltert wird. Dadurch entstehen höhere Kontraste für Blutgefäße, wodurch diese leichter zu erkennen sind.

Es folgte die Aufnahme der FLA-Bilder. Dabei wird eine Fluoreszein-Lösung innerhalb von 5 Sekunden antecubital (vor dem Ellenbogen) oder in eine andere geeignete Vene gespritzt, je nach gängiger Krankenhauspraxis. Eine Stoppuhr wird immer zum Zeitpunkt null gestartet und zu Beginn der Injektion wird das erste Kontrollbild des Augenhintergrundes aufgenommen. Nach vollständiger Injektion folgt das nächste Kontrollbild (siehe Ablaufplan Tabelle 10).

Phase	Zeitpunkt	Studienauge	Begleitauge
Frühphase	Start Injektionsgabe	2 Bilder Feld 2	-
	Transit < 45 Sekunden	Etwa 5-8 Stereopaarbilder Feld 2	-
Mittlere Phase	45 Sekunden – 2 Minuten	Bilder der Felder 4-7	-
	2 – 3 Minuten	Stereopaarbilder Feld 2	Stereopaarbilder Feld 2
Spätphase	2 – 5 Minuten	-	Bilder der Felder 4-7
	5 Minuten	Stereopaarbilder der Felder 1M, 2 und 3M	Stereopaarbilder der Felder 1M, 2 und 3M
	10 Minuten	Stereopaarbilder Feld 2	Stereopaarbilder Feld 2

**Tabelle 10: Ablaufplan der geforderten Bilder bei der FLA in der RELATION Studie**

Ungefähr 10 bis 16 Bilder sollten im Rahmen der klinischen Prüfung gemacht werden, wenn der Farbstoff im Studienauge anflutete, was nach ungefähr 15 Sekunden der Fall war. Dadurch erhielt man fünf bis acht Stereopaaraufnahmen.

In der mittleren Phase, die nach 45 Sekunden beginnt, sollten im Studienauge nicht-Stereofotos der peripheren Felder 4 bis 7 gemacht werden, sofort gefolgt von Stereoaufnahmen des Feldes 2 (Makula) des Studien- und des Partnerauges.

In der Spätphase, die nach drei Minuten beginnt wurden die Felder vier bis sieben des Nicht-Studienauges fotografiert. Bei Minute fünf folgten die Felder 1M, 2 und 3M zuerst vom Studienauge, danach vom Nicht-Studienauge. Nach zehn Minuten wurden einmal Stereoaufnahmen des Feldes 2 für beide Augen angefertigt, wie immer beginnend mit dem Studienauge.

Mit Hilfe des Farbstoffes Fluoreszein werden auf den FLA-Aufnahmen auch kleinste Gefäße dargestellt, sowie, anatomische Besonderheiten wie Mikroaneurysmen, Aussackungen, Leckagen oder nicht perfundierte Areale identifizierbar. Bei Vorhandensein permeabler Gefäße wie beim DMÖ, ist in der Spätphase die Verteilung des Farbstoffes außerhalb der Gefäße erkennbar.

Die Fluoreszenzangiographie wird bei DMÖ-Studien vor allem für die Identifizierung von Neovaskularisationen, makulärer Ischämie und zur Einteilung des DMÖ-Typs verwendet:

- Fokales DMÖ:  $\geq \frac{2}{3}$  der Leckage tritt überwiegend aus Mikroaneurysmen aus
- Diffuses DMÖ:  $\geq \frac{2}{3}$  der Leckage tritt überwiegend aus teleangiektatischen Kapillaren (unregelmäßig aufgeweitete Gefäße auf der Ebene der retinalen Kapillaren) aus
- Intermediäres DMÖ: Mischform aus fokalem und diffusem Ödem:  $< \frac{2}{3}$  der Leckage tritt aus Mikroaneurysmen oder teleangiektatischen Kapillaren aus

### **2.1.12.3 OCT-Messung zur Bestimmung der zentralen Retinadicke und weiterer Parameter**

Grundprinzip der OCT-Technologie ist die *Michelson-Interferometrie*. Dabei wird die Reflektion eines Lichtstrahls gemessen, den man auf die Netzhaut richtet. Über die unterschiedlichen Reflektionszeiten verschiedener Netzhautschichten können zwei- oder dreidimensionale Darstellungen der Netzhaut berechnet werden [167].

*Huang et al.* haben die Technologie und den schematischen Aufbau der Apparatur als erste beschrieben [168]. Abbildung 23 zeigt eine vereinfachte Darstellung eines sogenannten Time Domain OCT (TD OCT) Geräts.

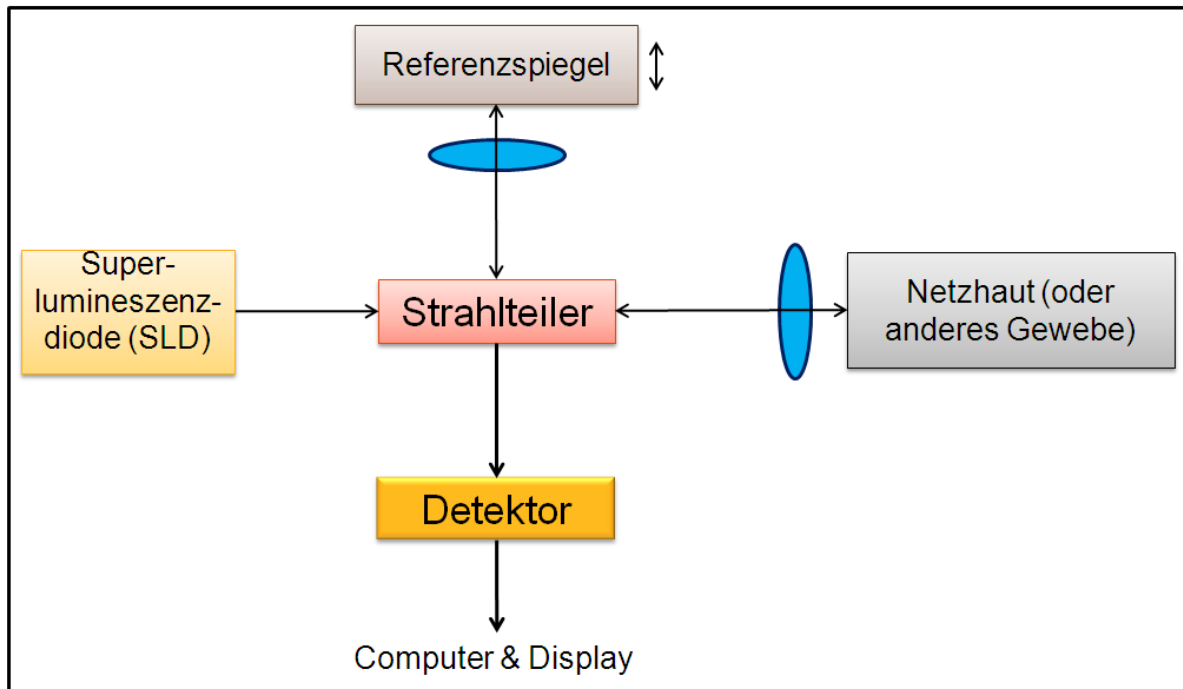


Abbildung 23: Schematische Darstellung eines Time Domain OCT nach Huang et al. [168]

Ausgehend von der Lichtquelle wird mit einem Strahlteiler das Licht im Verhältnis 1:1 auf zwei Strahlen (Referenz- und Messstrahl) aufgeteilt. Der Referenzstrahl wird von einem Spiegel, der Messstrahl von der Netzhaut reflektiert. Je nach Gewebstiefe legt der Lichtstrahl einen längeren Weg zurück. Durch Bewegung des Spiegels wird der Referenzstrahl so eingestellt, dass der Weg, den beide Strahlen zurücklegen nahezu gleich ist. So entsteht ein als Interferenz (Verstärkung der Amplituden) bekanntes Phänomen. Diese Interferenz – auch als A-Scan bezeichnet - wird von einem Detektor gemessen. Der reflektierende Spiegel bewegt sich kontinuierlich, so dass eine Reihe von Interferenzen entsteht, die sich aus der Reflektionszeit des Gewebes ergeben. Ein Computer berechnet aus den Interferenzen Bilder, die den Querschnitt der Retina zeigen und die als B-Scan bezeichnet werden (siehe Abbildung 24). Ein limitierender Faktor dieser Messung ist die mechanische Beweglichkeit des Spiegels. Die Eindringtiefe, die erfasst werden kann, ist ebenfalls limitiert. Durch Augenbewegung kann es zu Artefaktbildung auf den Bildern kommen, da die Geschwindigkeit der Messung geringer ist als eventuelle Augenbewegung.

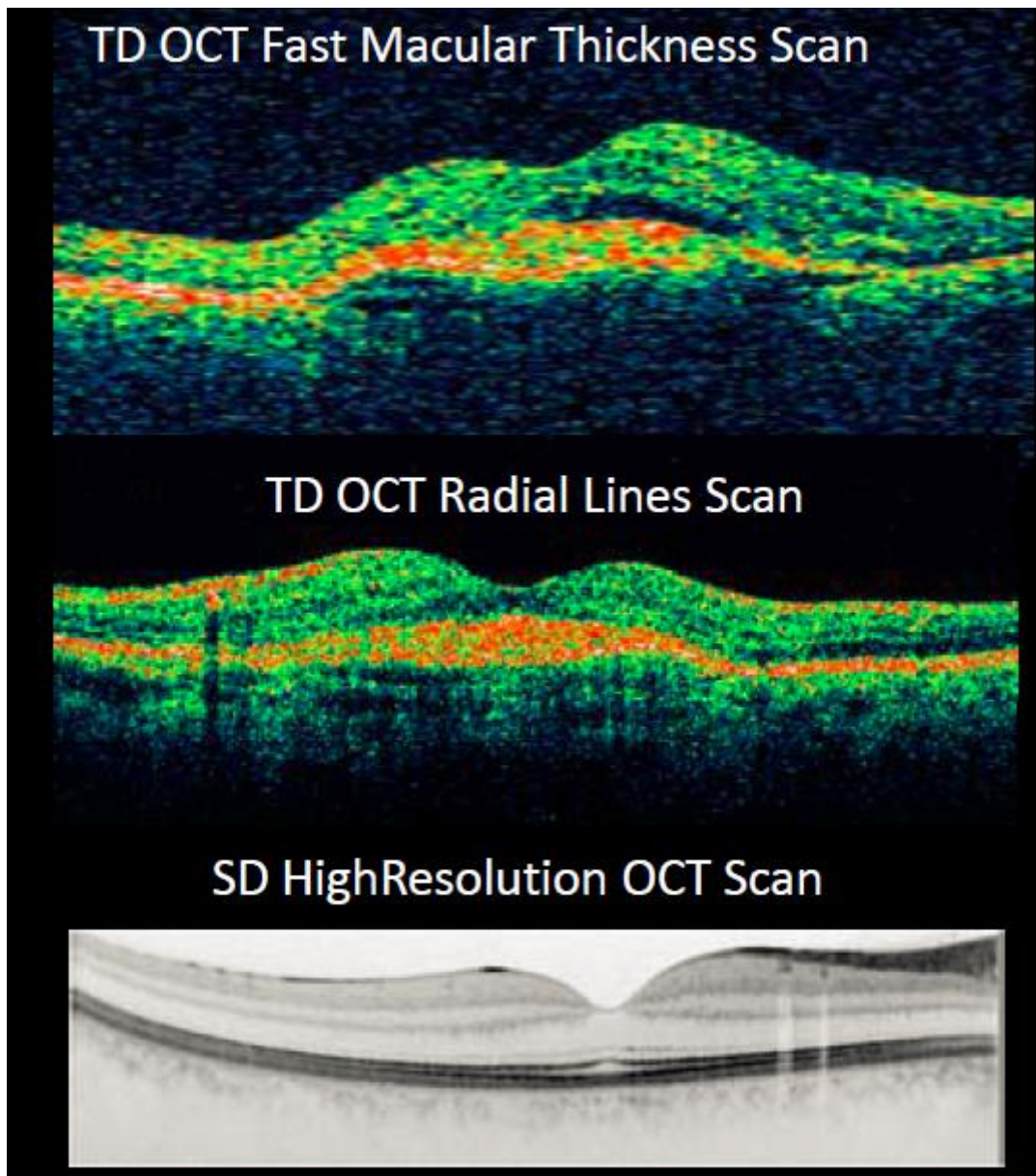


Abbildung 24: OCT Aufnahmen im Vergleich; mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Sandra Liakopoulos, Köln; TD: time domain, SD: spectral domain, OCT: optical coherence tomography

Die Weiterentwicklung des TD OCT stellt das Spectral-Domain (SD) OCT dar. Grundlage dieser Technologie ist die mathematische Gleichung von Fourier, die es ermöglicht, auf den beweglichen Spiegel zu verzichten [169]. Alle Reflektionen können simultan von einem Spektrometer gemessen werden, wie in Abbildung 25 dargestellt.



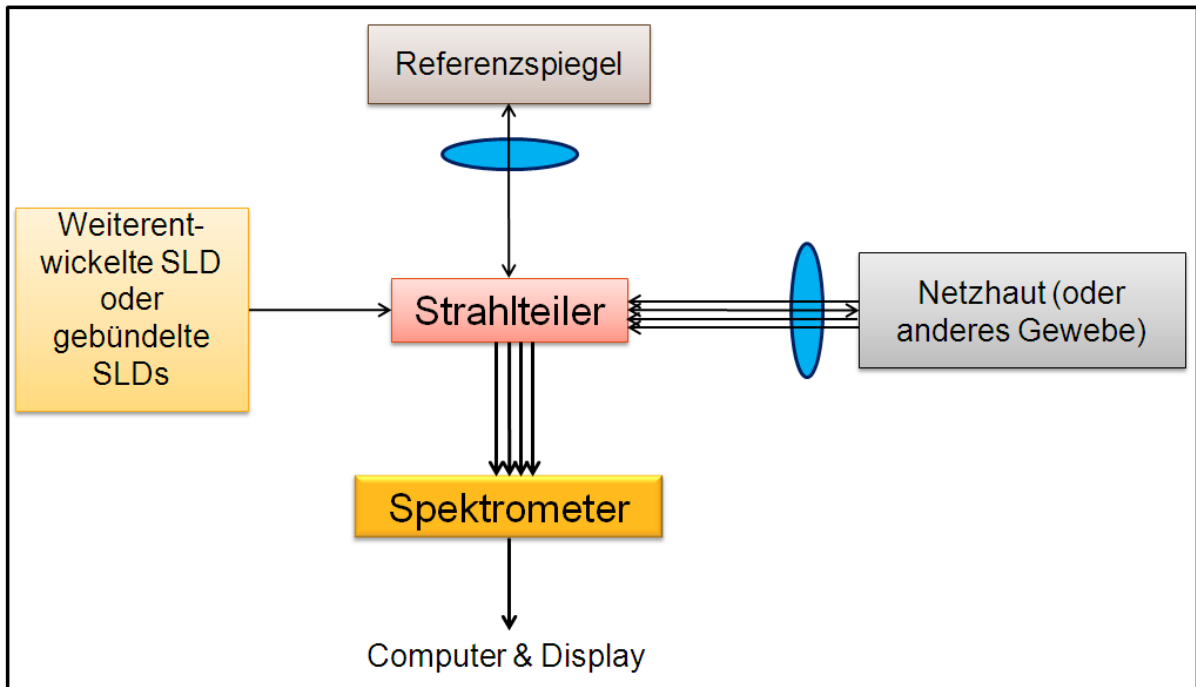


Abbildung 25: Schematische Darstellung eines Spectral Domain (SD) OCT nach *Chen et al.* [169]; SLD: Superlumineszenzdiode

Dadurch erhöht sich die Messgeschwindigkeit um den Faktor 50, wodurch Artefakte durch Augenbewegung auf den Bildern stark reduziert werden. Es können außerdem deutlich mehr Bilder gemacht werden und sogar 3D Simulationen der Netzhaut werden möglich.

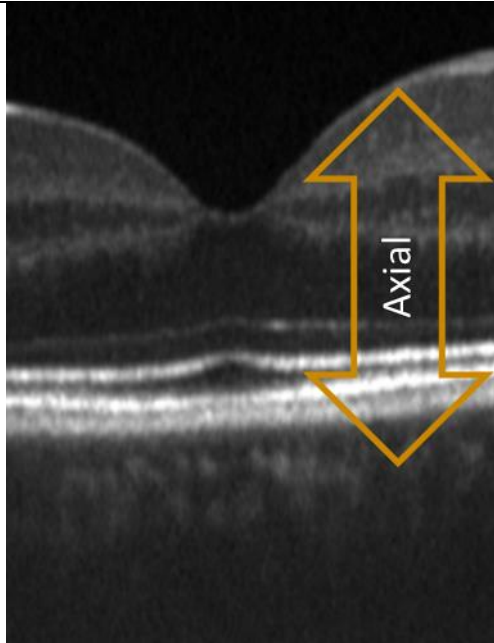


Abbildung 26: SD OCT Schnitt (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Sandra Liakopoulos, Uniklinikum Köln)

SD OCTs haben eine höhere Auflösung als das TD OCT.

- TD OCTs: Auflösung von 10  $\mu\text{m}$  mit 400 Axialscans pro Sekunde mit 128 A-Scans pro B-Scan
- SD OCTs: axiale Auflösung von 3-7 $\mu\text{m}$  mit 20,000 bis 50000 Axialscans pro Sekunde mit 512 A-Scans pro B-Scan, die in kürzerer Zeit vorliegen (155).

## SD OCT - Interpretation

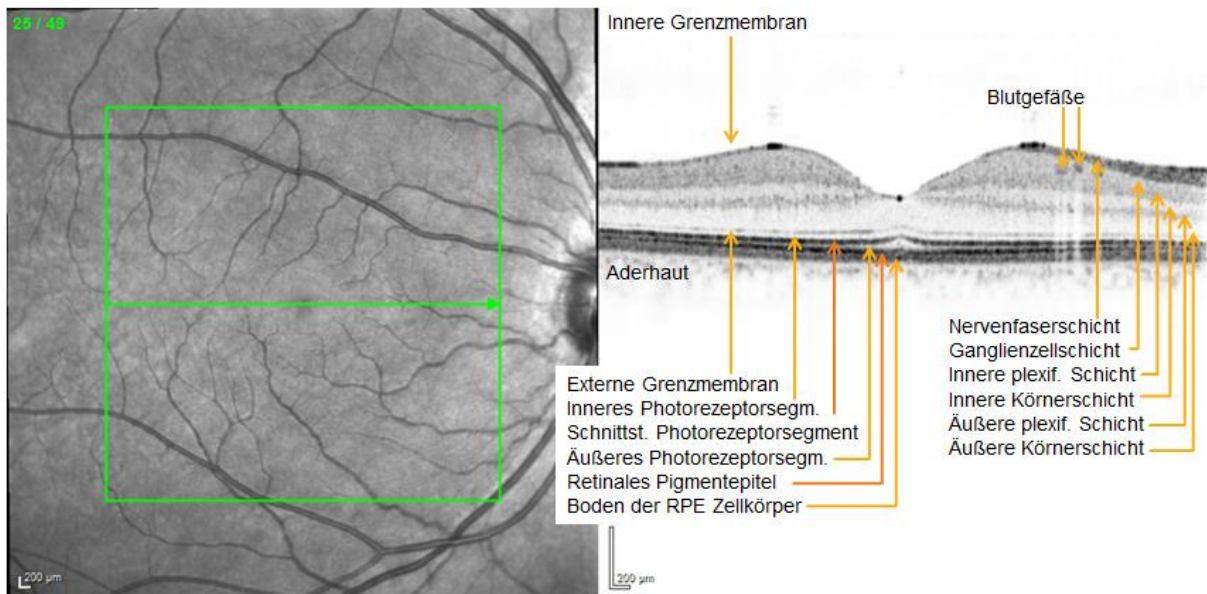
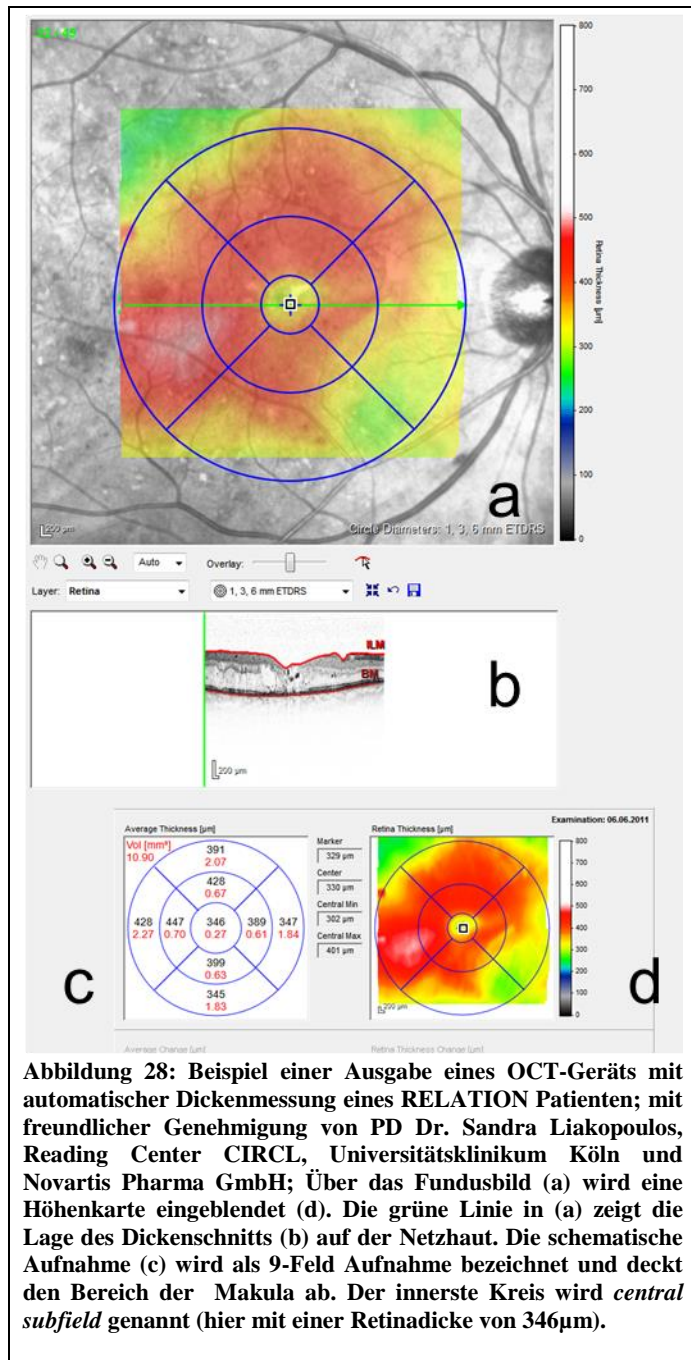


Abbildung 27: Aufnahme eines SD OCT und Interpretation (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Sandra Liakopoulos, Köln); SD: spectral domain, OCT: optical coherence tomography

Durch die hohe Auflösung werden detailliert die einzelnen Netzhautschichten sichtbar (Abbildung 27). Die optische Kohärenztomographie wird eingesetzt um pathologische Vorgänge in der Netzhaut nicht-invasiv zu messen und zu dokumentieren. Dafür kann man die von den Geräten automatisch gemessenen Dickenwerte der Netzhaut nutzen, welche zur Diagnose, Einschätzung von Krankheitsprogression oder Therapieansprechen verwendet werden (siehe Abbildung 28). Neue Geräte gleichen zudem die Augenbewegung aus und merken sich anhand anatomischer Eigenheiten die Position der Aufnahmen, so dass bei der nächsten Visite an genau denselben Stellen Aufnahmen gemacht werden können. In der RELATION Studie wurden Geräte mehrerer Firmen genutzt, die beiden Gerätegenerationen angehören. OCTs waren an jeder Studienvisite für das Studienauge vorgeschrieben, an Visite 1 und 14 auch für das Partnerauge (siehe Tabelle 9). Die von den Geräten berechneten zentralen Dickenwerte der Makula, wurden von den Studienzentren in die Dokumentationsbögen notiert und als sekundärer Endpunkt ausgewertet. Die Werte an Visite 2,6 und 14 wurden vom Reading Center nachgemessen und flossen in die Auswertung *weiterer anatomischer Parameter* ein. In Tabelle 11 sind alle geforderten Aufnahmen der bildgebenden Befunde der RELATION Studie zusammengefasst.



Bildgebung	Aufnahmen	
<b>Fundusphotos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fundus Reflex Fotografie beider Augen</li> <li>• Modifizierte 7-Feld Aufnahmen beider Augen</li> <li>• Stereoaufnahmen sollten von Feld 1M, 2 und 3M gemacht werden</li> </ul>	
<b>Rotfreie Aufnahmen</b>	Stereoaufnahmen beider Augen des Feld 2	
<b>FLA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modifizierte 7-Feld Aufnahme beider Augen</li> <li>• Bilder der frühen, mittleren und späten Phase</li> <li>• Felder 1M, 2 und 3M als Stereoaufnahmen</li> </ul>	
<b>OCT</b>	Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 mm <i>Fast Macular Thickness Map Scan</i> zentriert auf die Fovea</li> <li>• 6 mm <i>Radial Lines Scan</i></li> </ul>
	Spectralis OCT (Heidelberg Engineering)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 mm Star Scan (6 radiäre Scans, 30° Winkel zwischen den Scans, ART Modus mit 20 Bildern)</li> <li>• 6x6 mm Volume Scan (49 parallele B-Scans, ART Modus mit 20 Bildern)</li> </ul>
	Cirrus OCT (Carl Zeiss Meditec)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6x6 mm 3D Scan <i>Macular Cube 512x128</i></li> <li>• 6 mm 5 Line Raster</li> </ul>
	Topcon OCT (Topcon)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6x6 mm 3D Scan 3D 6,0 x 6,0 mm 512 x 128</li> <li>• 6 mm <i>Cross Scan</i></li> </ul>

Tabelle 11: Zusammenfassung der geforderten bildgebenden Befunde in der RELATION Studie

Entsprechende Ergebnisbögen des zentralen Reading Centers waren an die jeweilige Visite angepasst und teilten sich in vier Abschnitte auf: OCT, FP, FLA und generelle Auswertung.

Baseline:

Für alle Aufnahmen wurden Gerät, Vollständigkeit und Qualität erfasst, sowie:

- Anhand der OCT Aufnahmen:
  - die qualitative Beurteilung der Befunde (Vorhandensein eines Makulaödems, zystoider Räume, subretinaler Räume, Epiretinaler Membranen oder Vitreomakulärer Traktionen und Beteiligung des Zentrums der Fovea)
  - Makulaödem Typ (überwiegend zystoid/nicht-zystoid)
  - Retinadicke (Foveal Center Point, Dicke des sogenannten zentralen Subfields – Feld 9 (s. Abbildung 28), absolutes Volumen der Felder 1-9)
  - Subretinaler hyporeflektiver Raum (Foveal Center Point, Dicke des zentralen Subfields – Feld 9 (s. Abbildung 28), absolutes Volumen der Felder 1-9)
  - Kombination der beiden zuvor genannten

- Anhand der FP-Aufnahmen:
  - Fibröse Proliferation
  - Neovaskularisationen der Papille
  - Periphere Neovaskularisation
  - Glaskörperblutung und/oder präretinale Blutung
  - Frühere Panretinale Laserphotokoagulation
- Anhand der FLA Aufnahmen:
  - Anzeichen für Neovaskularisation der Papille
  - Anzeichen für periphere Neovaskularisationen
  - Anzeichen für makuläre Ischämie – Verlust des Kapillarbett im Feld 9 (ETDRS-Grading, s. Abbildung 28)
  - Anwesenheit einer Leckage, die eine Interpretation erschwert
  - Quelle der Leckage [170]

Im allgemeinen Reading Center Teil folgten dann Angaben vom Studienzentrum (Vorhandensein einer Rubeosis oder einer Glaskörperblutung), Einteilung des Retinopathie-Stadiums [166], Vorhandensein anderer Pathologien und ob die bildgebenden Befunde vom Reading Center auswertbar waren.

Bei der Visite 6 wurden die OCT-Befunde nochmal bewertet. Bei Visite 14 wurden alle 3 Befunde bewertet, bis auf ein paar wenige Fragen, die nur für die Baselineuntersuchung relevant waren.

### **2.1.13 Sicherheit**

Erfasst wurden alle unerwünschten Ereignisse (AE, adverse event; Definition im Anhang, Kapitel 8.3.1) und schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse (SAE, serious adverse event), Ergebnisse der ophthalmologischen Untersuchungen, die Messung des intraokularen Drucks, Vitalparameter und Laborwerte mit dem Ziel eine umfangreiche Einschätzung der Sicherheit der Therapie zu erhalten.

Ab dem Zeitpunkt der Randomisierung bis vier Wochen nach Ende der Studienteilnahme mussten alle SAEs und Schwangerschaften innerhalb von 24 Stunden nach Bekanntwerden an den Sponsor gemeldet werden.

### **2.1.14 Laborwerte**

An Visite 1 und 14 wurden für Standard-Laboruntersuchungen EDTA und Serumblut abgenommen. Im großen Blutbild wurde die Anzahl der roten und weißen Blutkörperchen, der Anteil der weißen Zellanteile, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozytenaktivität bestimmt. Außerdem wurde der HbA1c sowie die folgenden Werte erhoben: Serum Natrium, Kalium, Chlorid, Harnstoff, Harnstoff-Stickstoff, Kreatinin, Glucose, Gesamteiweiß, Albumin, Gesamt- und Direktbilirubin, Harnsäure, Phosphat, GOT, GPT, AP, LDH, Calcium.

Schwangerschaftstests wurden an Visite 1 und 14 mit Serum durchgeführt. Während der Studie wurden bei Bedarf Urin-Schwangerschaftstests verwendet.

### **2.1.15 Intraokularer Druck**

Die Messung des intraokularen Drucks (IOP: intraocular pressure) war an den Visiten 2, 6 und 14 für das Studienauge vorgesehen. Die Messung wurde vor und nach einer Injektion des Studienmedikaments durchgeführt. Wenn zusätzliche Messungen gemacht wurden, sollte der Wert im Dokumentationsbogen festgehalten werden. Die Art der IOP-Messung wurde dem Prüfzentrum

überlassen. Es gibt grundsätzlich zwei Methoden zur Augeninnendruck-Messung. Bei der Applanationstonometrie, wird mit einem Druckkörper, der auf die Hornhaut aufgelegt wird, gemessen, wie weit sich die Hornhaut eindrücken lässt. Damit kann man direkt auf den IOP schließen. Im Gegensatz dazu ist bei der Luftstoß-Noncontact-Tonometrie kein Kontakt mit der Kornea nötig. Bei dieser Methode wird ein Luftstoß auf die Hornhaut gerichtet und die Verformung mit einem Tonometer gemessen. Dieses Verfahren hat aber gewisse Nachteile wie z.B die Beschränkung des Einsatzes auf niedrige bis mittlere Drücke und die problematische Eichung [2], die dem klaren Vorteil eines Nichtkontaktverfahrens gegenüber stehen.

### **2.1.16 Standard-Ophthalmologische Untersuchungen**

Eine Spaltlampenuntersuchung und eine indirekte Stereophthalmoskopie wurden an jeder Visite mit dilatierter Pupille durchgeführt um signifikante Anomalitäten als unerwünschte Ereignisse zu dokumentieren.

### **2.1.17 Vitalparameter**

Körpergewicht und -größe wurden bei V1 erhoben, Puls, systolischer und diastolischer Blutdruck wurden an jeder Visite (außer V2) dokumentiert.

### **2.1.18 Dateneingabe und Analyse der Studienergebnisse, die unter 2.1.10 erhoben wurden**

Die statistischen Analysen aller Studienpatienten wurden von einem Statistiker festgelegt und die Gestaltung der Dokumentationsbögen im Projektteam besprochen. Für die Erstellung, Eingabe der Dokumentationsbögen in eine Datenbank und die Auswertung war ein Dienstleister verantwortlich.

Die Interpretation der Ergebnisse wurde nach Rücksprache mit dem Leiter der klinischen Prüfung (LKP), Novartis Statistikern und Mitarbeiter aus dem Bereich Klinische Forschung Ophthalmologie der Novartis Pharma GmbH durchgeführt.

Für die Hauptanalyse wurden vier verschiedene Studienpopulationen unterschieden. Das Randomized Set (RS) enthielt alle randomisierten Patienten. Im Full Analysis Set (FAS) waren alle Patienten mit wenigstens einer Behandlung (Schein-/ Ranibizumabinjektion und Laser) und einer Visusbestimmung nach der Baselinevisite enthalten. Das Per Protocol Set (PPS) umfasste alle Patienten, welche die vier vorgeschriebenen Pflichtinjektionen (Sham oder Ranibizumab) erhalten hatten und bei denen keine signifikanten Protokollverletzungen aufgetreten waren (signifikante Protokollverletzungen waren z.B. die Behandlungen mit einem anderen Anti-VEGF-Medikament als Ranibizumab). Im Safety Set wurden alle Patienten ausgewertet, die wenigstens eine Behandlung mit Studienmedikation (Schein, oder Ranibizumab und Laser) erhalten hatten und bei denen nach der Baselinevisite wenigstens eine Erhebung der Sicherheitsdaten Erfolg war.

Für diese Doktorarbeit wurde eine weitere Gruppe gebildet. Diese umfasste die RELATION Patienten, von denen Biomarkerproben an der Screening Visite vorhanden waren und die randomisiert wurden. Alle Ergebnisse der RELATION Studie dieser Arbeit, wurden mit der Biomarker-Population beschrieben und unterscheiden sich daher in der Fallzahl vom Full Analysis Set, das vom o.g. Dienstleister ausgewertet wurde. In der Biomarkergruppe gab es keine Protokollverletzer, die von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Für den primären Endpunkt der FAS-Analyse wurde die Änderung des BCVA zwischen Baseline und Visite 14 herangezogen. Die Nullhypothese sollte abgelehnt werden, wenn es einen Unterschied

zwischen kombinierter Behandlung (von Ranibizumab und Laserphotokoagulation) und der Lasermonotherapie (plus Scheinbehandlung) gibt. Das Signifikanzlevel war mit 5 % für den zweiseitigen Test angegeben und die Konfidenzintervalle mit 95 %. Es wurde eine ANCOVA Analyse für den primären Endpunkt gerechnet und als Kovariate die Faktoren Zentrum, Behandlung, DMÖ-Typ (fokal/intermediär/diffuse), PDR vorhanden (ja/nein) und Baseline BCVA berücksichtigt.

Binäre sekundäre Endpunkte wurden in der FAS-Analyse mit Absolutwerten und relativer Häufigkeit angegeben. Der zeitliche Verlauf der BCVA wurde graphisch dargestellt, CRT, anatomische Parameter und PDR-Progression deskriptiv ausgewertet.

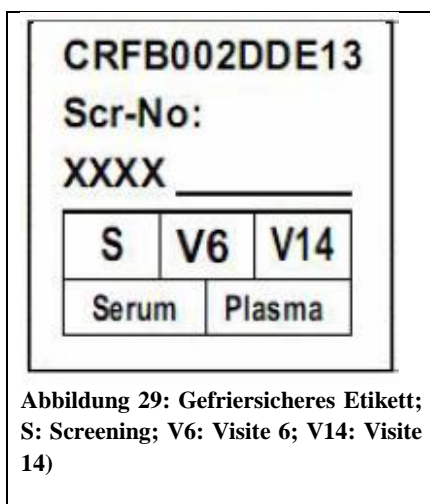
Die Fallzahl wurde dahingehend berechnet, dass ein Effektunterschied beim Visus von 4,5 Buchstaben mit 90 %iger Sicherheit, bei einem zweiseitigen 5 % Level mit einer Standardabweichung von 10 Buchstaben, nachgewiesen werden konnte. Der statistische Analyseplan wurde vor Entblindung der Randomisierung fertiggestellt.

In dieser Doktorarbeit werden die Ergebnisse der statistischen Analysen mit der Biomarker-Subgruppe analog der FAS-Analyse berechnet.

## 2.2 Biomarkeruntersuchungen

### 2.2.1 Probenentnahme, Aufbereitung und Lagerung

Die Blutprobenabnahme war für jeden Patienten vorgesehen. In der Einwilligungserklärung wurden die Patienten darüber aufgeklärt, dass Ihre Blutproben für Biomarkeruntersuchungen verwendet werden. An den Zentren, die an der Biomarker-Untersuchung teilnahmen, wurden eine 7,5 ml Serum-Monovette® und eine 7,5 ml EDTA-Monovette mit Blut abgenommen. Diese sollten sofort ausreichend und vorsichtig gemischt fünf Minuten lang bei 3500 bis 4500 U/min zentrifugiert werden. Pro Monovette wurden aus dem Überstand sechs Aliquoten mit jeweils ungefähr 0,5 ml Serum bzw. Plasma in Cryocups gegeben.



Die 12 Aliquoten wurden mit gefriersicheren Etiketten gekennzeichnet (Abbildung 29). Auf den vorgedruckten Etiketten befand sich die Zentrennummer. Die Patientennummer wurde handschriftlich vom Zentrumspersonal eingetragen, die Visite (S, V6 oder V14) angekreuzt und das nun fertig beschriftete Etikett auf die Cryocups geklebt. Die Cryocups, mit weißen Deckeln für Serumproben und blauen Deckeln für Plasmaproben, lagerten am Studienzentrum bis zu zwei Monate bei -18°C. Danach wurden Sie auf Trockeneis an den Lehrstuhl für Pharmakologie in Regensburg versandt, wo sie bis zur Vermessung bei -80°C lagerten.

Die Zytokinbestimmung erfolgte aus den frisch aufgetauten Proben. Für die übrigen Marker wurden Aliquoten aus den aufgetauten Cryocups entnommen, wieder eingefroren und kurzfristig (2-4 Wochen) bei -20°C zwischengelagert. Sämtliche Untersuchungen wurden mittels Luminex oder ELISA (IL-6) im Labor für NeuroEndocrino Immunology des Uniklinikums Regensburg durchgeführt.

## 2.2.2 Bestimmung der Biomarkerkonzentration mit dem Luminex Gerät

### 2.2.2.1 Prinzip der Luminex® Messung:

Bei der verwendeten Luminex xMAP Technology kommen farbcodierte Beads (Mikrosphären) zum Einsatz, die zwei verschiedene Färbungen verwenden. Indem diese zwei Färbemittel unterschiedlich konzentriert werden, erhält man 100 spezifisch gefärbte Beads, die als *label* fungieren. Ein spezifisch gefärbtes Bead ist mit genau einem Antikörper gekoppelt. Das in der Probe zu untersuchende Antigen bindet an den Antikörper-Anteil eines Beads. Ein weiterer Panel-spezifischer Antikörper dient der Detektion. Streptavidin-PE Konjugat wird abschließend als quantifizierbares Reportermolekül hinzugegeben und bindet an den Detektionsantikörper. Bei der Messung liegen die Bead-Komplexe in einer Lösung vor und werden mit einer Pumpe angesaugt. Dabei passieren die Bead-Gemische zwei Laserstrahlen. Der eine Laser regt die farblich markierten Beads an, der andere Laser das fluoreszierende Streptavidin-PE Konjugat. Signalprozessoren identifizieren jedes einzelne Bead anhand seiner individuellen Farbe und quantifizieren die Ergebnisse auf Grund des fluoreszierenden Reportermoleküls. Die unterschiedlich gefärbten Beads für verschiedene Biomarker können zu einem gewissen Grad gemischt werden, so dass mit einer Probe mehrere Biomarker parallel identifiziert und quantifiziert werden können.

Zusammengefasst werden in einem Messdurchgang Beads zur Identifikation der jeweiligen Antigene eingesetzt und Antikörper nach Farbstoffkopplung zur Quantifizierung genutzt.

### 2.2.2.2 Vorbereitung des Geräts und allgemeine Angaben zur Messung und Auswertung

Für die Messung ist eine Pumpe nötig, die Zu- und Ablauf eines neutralen Sheath Fluids (Lösungsmittel) reguliert, da die Proben beim Vermessen gelöst und durch den Laserweg gepumpt werden. Die Laser im Gerät müssen Betriebstemperatur haben, bevor mit Messungen begonnen werden kann. Als Ausgabegerät ist ein PC mit Bildschirm angeschlossen.

Die Ansaugvorrichtung wird zuerst kalibriert. Danach werden Ansaugnadel und Schläuche mit Alkohol gespült. Es folgen zwei Spüldurchgänge der Nadel und Schläuche mit Sheath Fluid.

Bevor die eigentliche Messung beginnt, programmiert man die Plattenbelegung der Wells ein. Man kann dabei festlegen, auf welche Positionen Background (reines Lösungsmittel), Standards für die Standardkurve und Kontrollen (mit bekannter Konzentration) gegeben werden und ob ggf. Leerwells übersprungen werden sollen. Darüber hinaus wird das Messvolumen, die Messzeit, die pro Well maximal aufgewendet werden soll, die Anzahl an Events pro Bead und die Bead Region (=Farbcodes die vermessen werden sollen) eingegeben. Mit der Einstellung des Gate Settings wird der Messbereich auf die für die Biomarker relevanten Bereiche eingeschränkt. Somit kann die Messzeit deutlich verkürzt werden.

Für jedes zu untersuchende Agens werden die Konzentrationen der Standardkurve eingegeben und eine Funktion hinterlegt, anhand derer die Probenwerte berechnet werden. Normalerweise eignet sich die 5 Parameter Transformation  $[F(x) = A + (D/1 + (X/C)^B)^E]$  eine asymmetrische Funktion, bei biologischen Assays am besten.

Es folgt die Vermessung der ganzen Platte.

Ist die Messung abgeschlossen, betrachtet man als erstes die Standardkurve und prüft ob alle Werte der Kurve verwendet werden können. Gegebenenfalls entfernt man Ausreißer oder ändert die Funktion der Standardkurve. Um die Genauigkeit der Messung zu beurteilen, überprüft man die gemessenen Werte für die Kontrollsubstanzen mit den Herstellerangaben.



Danach wird das Gerät gereinigt. Dafür verwendet man zuerst bidestilliertes Wasser und danach Ethanol um Nadel und Schläuche zu spülen.

### 2.2.2.3 Messung von IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1 und VEGF

Für die Untersuchung von IL-8, IL-10, IL-17, MCP-1 und VEGF wurde das MILLIPLEX® MAP Human Cytokine / Chemokine Kit der Firma Millipore verwendet. Im Folgenden sind die Vorgänge für die Vorbereitung und Messung einer Platte beschrieben.

Die Beadmischung für die gewünschten Biomarker wird aus den vom Hersteller gelieferten Einzellösungen für spezifische Biomarker hergestellt. Jedem der 5 Zytokinbeadlösungen werden 60 µl entnommen und in eine Mischflasche gegeben. Mit Bead Diluent wird auf ein Gesamtvolumen von 3mL aufgefüllt (5x60 µl Zytokinbeadlösung + 2700 µl Bead Diluent = 3 mL Beadmischung). Idealerweise wird das Bead Diluent vorgelegt. Die Beads sind lichtempfindlich und werden daher in einem lichtundurchlässigen Gefäß gelagert und gemischt. Es muss während der ganzen Entwicklung eines Kits darauf geachtet werden, dass möglichst wenig Licht an das Kit gelangt, nachdem die Beads zugegeben wurden. Vor dem Mischen werden die Fläschchen mit den Beads zuerst 30 Sekunden ins Ultraschallbad geben und eine Minute auf dem Vortexer gemischt, damit eine homogene Lösung entsteht. Nach dem Mischen sollte das Mischgefäß regelmäßig mit Hilfe des Vortexmischers durchgemischt werden, vor allem direkt bevor die Mischung auf die Platte pipettiert wird. Das gilt für alle Luminex Assays.

Die lyophilisierten Kontrollen werden mit 250 µl entionisiertem Wasser rekonstituiert und mindestens fünf Minuten lang bzw. bis zum vollständigen Lösen gewartet. 30 ml Waschpuffer werden mit 270 ml entionisiertem Wasser gemischt. Zur ebenfalls lyophilisierten Serummatrix wird 1,0 ml entionisiertes Wasser gegeben und wenigstens 10 Minuten gewartet, bis sich das Lyophilisat vollständig gelöst hat.

Die lyophilisierte Standardlösung wird mit 250 µl entionisiertem Wasser rekonstituiert. Dadurch entsteht eine Standardlösung mit der Konzentration 10000 pg/ml für jede der zu untersuchenden Komponenten. Eine 1:5 verdünnte Standardreihe wird hergestellt, in der jeweils 200 µl Assay Buffer vorgelegt und 50 µl aus der nächsthöheren Konzentration entnommen werden. Daraus ergeben sich die in Tabelle 12 dargestellten Konzentrationen:

Konzentration [pg/ml]
10000
2000
400
80
16
3,2
0,64

**Tabelle 12: Verdünnungsreihe des Zytokin Assays**

Als Background wird Assay Buffer verwendet. Die Serumproben der Patienten werden nicht sofort auf die 96-Well-Filterplatte gegeben. Das liegt daran, dass die relativ zähflüssigen Proben oft nicht abgesaugt werden können. Daher behilft man sich mit folgendem Vorgehen: 25 µl Assay Buffer werden in einer anderen Platte vorgelegt. Danach werden 25 µl pro Serumprobe dazugegeben. Jeweils 25 µl Background, Standardverdünnungen und Kontrollen werden auf die entsprechenden Wells gegeben. Dazu werden jeweils 25 µl Serum Matrix gegeben.

Somit befinden sich in jedem Well 50 µl (25 µl Probe + 25 µl) Assay Buffer bzw. 25 µl Background oder Standards oder Kontrollen + 25 µl Serum Matrix). Es folgen 25 µl Beadlösung je Well. Die Platte wird mit einem lichtundurchlässigen Deckel oder Alufolie vor Licht geschützt.

Die Platte wird über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler entwickelt. Am nächsten Morgen wird das Gemisch auf eine 96-Well Filterplatte übertragen. Um noch verbleibende Reste aus der 96-Well Platte zu gewinnen, wird circa 100 µl Waschpuffer dazugegeben, geschüttelt und in die entsprechenden Wells der Filterplatte gegeben. Nun werden die Probengemische durch die Filterplatte von unten her abgesaugt und zweimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen. Die Bead-Zytokin-Mischung befindet

sich nun in den Filtern der Platte. Im Anschluss werden in jedes Well 25 µl Detection Antibody gegeben und eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Es folgt die Zugabe von 25 µl des fluoreszierenden Streptavidin-Phycoerythrins und eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf dem Schüttler. Das Gemisch wird mittels Vakuumpumpe abgesaugt und zweimal mit Waschpuffer gewaschen und abgesaugt. Die zu vermessenden Komplexe bleiben im Filter. Zu den Proben werden nun 150 µl Sheath Fluid in jedes Well pipettiert. Die Platte ist nun zum Vermessen bereit.

Wie oben beschrieben wird das Gerät vorbereitet, inklusive Spülen, Aufwärmen des Lasers und Programmierung der Plattenbelegung. Die Platte wird eingelegt und die Messung wird gestartet. Schon während der Messung kann man Standardkurve und Kontrollen beurteilen und falls Ausreißer vorhanden sind, die Standardkurve anpassen. Die Probenwerte werden anhand der Standardkurve berechnet und können nach Ende der Messung in ein Excel-File exportiert werden.

#### 2.2.2.4 Messung von sVCAM-1 und sICAM-1

SVCAM-1 und sICAM-1 wurden mit dem MILLIPLEX® MAP Kit Human Neurodegenerative Disease Panel 3 #HNDG3-36K von Millipore durchgeführt. Die Proben werden zunächst aufgetaut und mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt (20 µl in 1980 µl bzw. 10 µl in 990 µl). Danach gibt man jeweils 150 µl der Antibody-Immobilized Beads von sICAM-1 und sVCAM-1 zu 2700 µl Bead Diluent. Die lyophilisierten Kontrollen 1 und 2 und der lyophilisierte Standard werden mit 250 µl entionisiertem Wasser gelöst.

Aus den Standardlösungen wird eine Verdünnungsreihe in 1:4-Schritten hergestellt (Tabelle 13):

Verdünnungsgrad	sVCAM-1 (pg/ml)	sICAM-1 (pg/ml)
1:4098	61	24
1:1024	244	98
1:256	977	391
1:64	13906	1563
1:16	15625	6250
1:4	62500	25000
<b>Originalkonzentration</b>	250000	100000

Tabelle 13: Verdünnungsreihe der Adhäsionsmoleküle

Es folgen die weiteren Messvorbereitungen analog dem Zytokin Assay, abgesehen davon, dass der Übertragungsschritt wegfällt, da die Proben nicht zähflüssig sind. Es werden jeweils 25 µl Standard, Kontrolle, Background oder die verdünnten Serumproben in die Wells gegeben und nach Zugabe von 25 µl des Beadgemisch bei 4°C über Nacht (16-20 Stunden) lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Nach Absaugen mit

Vakuum und dreimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer, wird 25 µl Detection Antibody zugegeben, bei Raumtemperatur und einer weiteren Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Es folgt die Zugabe von 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin pro Well. Die Platte wird weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur entwickelt. Ein letztes Mal wird mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und Rückstände von Detektion Antibody und Streptavidin-PE durch dreimaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer entfernt. Nun werden 100 µl Sheath Fluid in die Wells pipettiert. Nachdem die Platte fünf Minuten auf dem Schüttler gemischt wurde, kann sie vermessen werden.

Bei der Auswertung wurde der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

#### 2.2.2.5 Messung der Apolipoproteine

Die Apolipoproteine wurden mit dem Milliplex MAP Kit® Human Apolipoprotein 96 Well Plate Assay von Millipore gemessen (Cat. # APO-62K).

Bei diesem Kit werden die Serumproben mit dem Faktor 10000 verdünnt. Dabei werden in Deep-Well Platten 495 µL PBS vorgelegt und 5µl Serumproben dazugegeben. Von dieser Mischung werden dann noch einmal 5 µl mit 495 µl PBS verdünnt. Zur Herstellung der Beadmischung werden 150 µl Antikörper-immobilisierte Apolipoprotein Beads in die Mischflasche zu 2,1 ml Beadlösung gegeben.

Sowohl Kontrollen als auch das Standardlyophilisat werden mit 250 µl entionisiertem Wasser gelöst. In 1:5 Verdünnungsschritten wird die Standardreihe angefertigt bei der jeweils 160 µl Assay Buffer vorgelegt werden (Tabelle 14):

Apo-A1 [ng/ml]	Apo-A2 [ng/ml]	Apo-B [ng/ml]	Apo-C2 [ng/ml]	Apo-C3 [ng/ml]	Apo-E [ng/ml]
100000	19000	77000	1400	4200	700
20000	3800	15400	280	840	140
4000	760	3080	56	168	28
800	152	616	11,2	33,6	5,6
160	30,4	123,2	2,24	6,72	1,12
32	6,08	24,64	0,448	1,344	0,224
6,4	1,216	4,928	0,0896	0,2688	0,0448
1,28	0,2432	0,9856	0,0179	0,05376	0,00896

**Tabelle 14: Verdünnungsreihen der Apolipoproteine**

Die weiteren Aufbereitungsschritte erfolgen analog dem Verfahren der Adhäsionsmolekülen (siehe Kapitel 2.2.2.4).

### 2.2.2.6 Messung von IL-6

IL-6 wurde mit dem Quantikine® HS High Sensitivity ELISA von R&D Systems für Humanes IL-6 vermessen. Der Nachteil des ELISA Verfahrens ist, dass man nur ein Zytokin auf einmal vermessen kann und eine größere Menge Serum benötigt.

Aus der 10 pg/ml Stammlösung wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt (Tabelle 15):

IL-6 [pg/ml]
10
5
2,5
1,25
0,625
0,312
0,156
0,078

**Tabelle 15: IL-6 Verdünnungsreihe**

Waschpuffer, Substratlösung, Verstärkerlösung und Kalibratorlösung werden vorbereitet. 100 µl Assaylösung werden in den Wells vorgelegt. Je 100 µl Standard oder Probe werden zugegeben und zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem 6mal mit Waschpuffer gewaschen wurde werden zu jedem Well 200 µl Konjugat gegeben und weitere zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nach weiteren sechs Waschvorgängen folgen 50 µl Substratlösung pro Well, wonach 60 Minuten gewartet werden muss. Nach Zugabe von weiteren 50 µl Verstärkerlösung und weiteren 30 Minuten Entwicklungszeit gibt man 50 µl Stopp Lösung in die Wells, damit die Farbreaktion nicht weiterläuft. Nun sollte innerhalb von 30 Minuten bei 490 nm gemessen werden. Alle Inkubationsschritte finden bei Raumtemperatur statt. Mit Hilfe der Standardkurve werden die IL-6 Werte berechnet.

Das Prinzip hinter der Messung folgt dem Sandwich Enzym Immunassay Prinzip. Die Wells sind mit einem monoklonalem IL-6 Antikörper gecoated. In der Probe befindliches IL-6 bindet daran. Nach den Waschvorgängen wird ein weiterer, IL-6-Antikörper (polyklonal) zugegeben, Überschüsse wieder entfernt und das Substrat (NADPH) zugegeben. Dieses bindet an den Antikörper und nach Zugabe eines Verstärkermoleküls mit einem Farbstoffanteil, entwickelt sich eine messbare Farbe. Vor dem Messen gibt man eine Stop Substanz (2 N Schwefelsäure) zu, die eine weitere Reaktion verhindert, so dass eine standardisierte IL-6 Messung erfolgen kann.

## 2.3 Allgemeine Annahmen & Vergleichskollektive

Lag die gemessene Konzentration einer Probe unter der Nachweisgrenze, so wurde die Hälfte des niedrigsten gemessenen Wertes der Standardkurve verwendet. Bei Messung einer Konzentration über der

Nachweisgrenze, wurde, wie in solchen Fällen üblich, der höchste gemessene Wert der Standardkurve herangezogen.

Die Blutproben von Vergleichskollektiven wurden von den folgenden Personen dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt:

- Gesunde Probanden, *Normalkollektiv*: Prof. Dr. Rainer H. Straub, Dept. of Internal Medicine I, Labor für Experimentelle Rheumatol. & Neuroendocrine Immunology, Universitätsklinikum Regensburg
- Frühe Diabetiker und Patienten mit Glucoseintoleranz: Prof. Dr. med. habil. Markolf Hanefeld, Centre for Clinical Studies of GWT-TUD GmbH
- Diabetes Mellitus Patienten aus der Nephrologie: Prof. Dr. med. Markus van der Giet - Charité - Campus Benjamin Franklin - Transplantationszentrum – Berlin
- Urtikaria-Patienten: Prof. Dr. Marcus Maurer, Dpt. of Dermatology and Allergy, Allergie-Centrum-Charité/ECARF, Charité - Universitätsmedizin Berlin
- MS-Patienten: Prof. Dr. Friedmann Paul, NeuroCure Clinical Research Center, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte

Für alle Vergleichsproben lag eine unterschriebene Einverständniserklärung der Patienten vor und die Patientendaten waren pseudonymisiert.

## **3 Ergebnisse**

Das Kapitel Ergebnisse ist in drei Themengebiete gegliedert:

- Ergebnisse der klinischen Endpunkte der RELATION Studie anhand der Zentren- und Reading Center Daten.
- Ergebnisse der Biomarkeruntersuchungen der RELATION Patienten inklusive Betrachtung im Zusammenhang mit den klinischen Parametern
- Vergleich der Biomarkeruntersuchungen der RELATION Patienten mit den Messungen gesunder Probanden und anderen Krankheitskollektive.

### **3.1 Ergebnisse der klinischen Parameter der RELATION Studie**

Die RELATION Studie war mit einer 12-monatigen Behandlungsphase und einer einjährigen Follow-Up Phase geplant. Leider musste die Studie nach einer Rekrutierungszeit von 11 Monaten abgebrochen werden. Kurz zuvor war die Zulassung für Ranibizumab zur Behandlung der Visusbeeinträchtigung auf Grund eines DMÖ erteilt worden. Das Studienteam hielt es in Folge für unethisch, Patienten weiterhin in den Laserarm zu randomisieren, der wie sich zwischenzeitlich herausgestellt hatte, der Ranibizumabtherapie unterlegen war. Eine Änderung des Prüfplans wurde mit dem Paul-Ehrlich Institut diskutiert (Einführung eines Ranibizumab Monoarms und Umstellen der Patienten aus dem Laser Monoarm in den Kombiarm). Dieser Vorschlag wurde aber abschlägig beschieden, da diese Änderungen vom ursprünglichen Ziel der Studie zu stark abwichen. Von den geplanten 300 Patienten waren bis dahin 128 Patienten randomisiert worden. Die Studie wurde an 59 Zentren angemeldet, von denen 36 Zentren Patienten in die Studie randomisiert hatten.

Die Ergebnisse der Gesamtstudienpopulation wurden an anderer Stelle berichtet (Clinical Study Report der Studie; Abstracts, Poster und Präsentationen auf internationalen und deutschen Ophthalmologischen Kongressen wie WOC, ARVO, AAO, DOG; die Gesamtpublikation ist in Arbeit).

In dieser Dissertation werden die Ergebnisse der Patienten vorgestellt, die randomisiert wurden und von denen wenigstens an Visite 1 Biomarker-Proben zur Verfügung standen. An manchen Zentren war die Probenentnahme aus logistischen Gründen nicht möglich (Zentren 01, 11, 15, 44, 60) bzw. wurde nur bei einem Teil der Patienten durchgeführt (Zentrum 39).

Somit werden auf den nächsten Seiten die Ergebnisse von der 114 der 128 randomisierten RELATION Patienten besprochen.

#### **3.1.1 Baselinecharakteristika**

In Tabelle 16 sind die Baselinecharakteristika der 114 Biomarker-Patienten inklusive Aufteilung in die Behandlungsgruppen dargestellt.

Behandlung	Kombination	Laser	Gesamt	
Anzahl Patienten (n)	76	38	114	
Alter (Jahre, Mittelwert)	64,0	63,7	63,9	
Geschlecht (%)				
• Männer	63,2	60,5	62,3	
• Frauen	36,8	39,5	37,7	
Diabetestyp (%)				
• Typ 1 Diabetes Mellitus	10,5	13,2	11,4	
• Typ 2 Diabetes Mellitus	85,5	84,2	85,1	
DMÖ Diagnose seit (Jahren, Mittelwert)	1,6	3,0	2,1	
HbA1c (%)	7,5	7,5	7,5	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30,0	30,2	30,1	
Visus bei Baseline (ETDRS-Buchstaben)	61,4	64,5	62,4	
Zentrale Retinadicke Baseline [µm] laut Zentrum	442,7	501,8	462,8	
Retinopathie-stadium gemäß Reading Center ETDRS Kriterien mittels stereoskopischer Fundusphotos* (%)	Fragliche DR	1,3	0	0,9
	NPDR	72,4	73,7	72,8
	Milde PDR	13,2	5,3	10,5
	Moderate PDR	10,5	7,9	9,6
	Nicht auswertbar	2,6	13,2	6,1
PDR vorhanden laut Zentrum (%)	21,1	13,2	18,4	
PDR vorhanden laut Reading Center (RC) (%) <sup>1</sup>	23,7	13,2	20,2	
Neovaskularisation vorhanden laut RC anhand FLA* (%)				
• NVD*	3,9	7,9	5,3	
• NVE*	22,4	5,3	16,6	
Ischämie vorhanden lt. RC in Field 9*				
• Vorhanden	31,6	28,9	30,7	
• Moderat	15,8	21,1	17,5	
• Schwer	7,9	7,9	7,9	
Art des Ödems	Fokal	14,5	15,8	14,9
	Intermediär	39,5	42,1	40,4
	Diffus	43,4	39,5	42,1
	>50 % from Confounding Factors	1,3	0	0,9
	Cannot Grade (%)	1,3	0	0,9
Vorgelaserte Patienten (%)	71,1	68,8	69,3	

Tabelle 16: Baseline Werte der RELATION Patienten

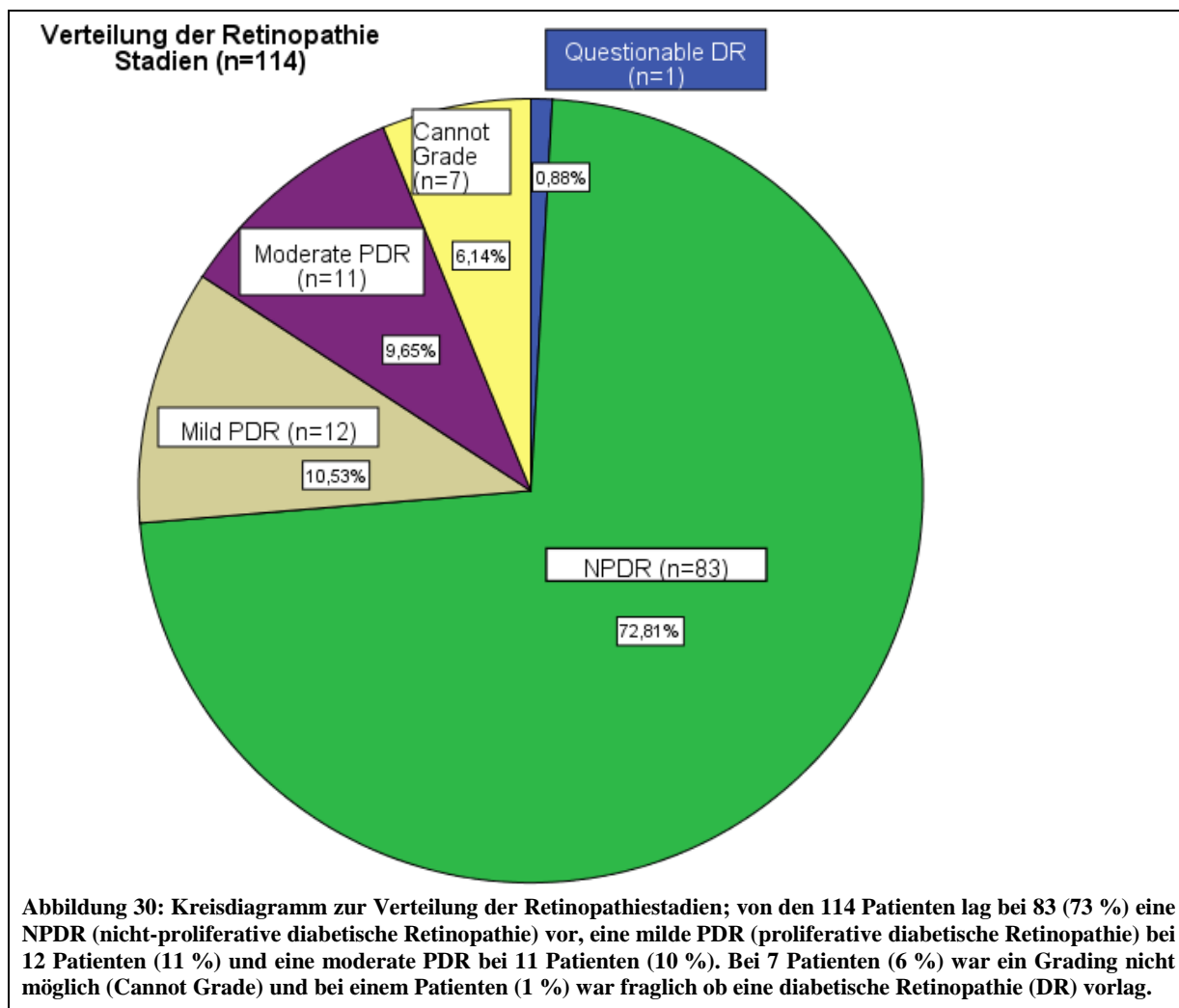
\* Für diese Auswertungen lagen dem Reading Center Daten von 113 Patienten vor, 76 in Kombinationsgruppe, 37 in Lasergruppe; Für die Einteilung der Retinopathie Stadien wurden die Kriterien nach ETDRS Report Nummer 12 [166] verwendet. <sup>1</sup>Patient hatte mindestens NVD oder NVE oder beides auf FLA und/oder FP; NVD: Neovaskularisation der Papille (vom englischen Disc), NVE: Neovaskularisation außerhalb (vom englischen *elsewhere*, bezeichnet Neovaskularisation die fern der Papille vorliegen), DR: Diabetische Retinopathie, ETDRS: early treatment diabetic retinopathy study, FLA: Fluoreszein Angiographie, FP: Fundusphotographie, NPDR: nicht proliferative

**diabetische Retinopathie, PDR: proliferative diabetische Retinopathie; RC: Reading Center, T1DM: Typ 1 Diabetes Mellitus, T2DM: Typ 2 Diabetes Mellitus**

Die Patienten waren durchschnittlich 64 Jahre alt, davon 62 % Männer. 85 % der Patienten waren Typ 2 Diabetiker. Der HbA1c lag durchschnittlich bei 7,5 % und der BMI bei 30 kg/m<sup>2</sup> was für Diabetiker nicht unüblich ist. Die Diagnose des DMÖ lag bei Patienten im Laserarm längere Zeit zurück als bei Patienten im Kombiarm, wobei der Unterschied nicht signifikant war (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben auf dem 5 % Signifikanzniveau). Die Patienten starteten mit einem bestkorrigierten Visus bei 61 bzw. 65 Buchstaben (Kombi bzw. Laser) und einer zentralen Retinadicke (vom Zentrum gemessen) von 443 bzw. 502 µm. Bei etwa 72 bzw. 74 % der Patienten in beiden Behandlungsgruppen lag eine nicht-proliferative Form der diabetischen Retinopathie (NPDR) vor. Dieses wurde anhand der ETDRS Kriterien vom Reading Center ausgewertet, wobei die stereoskopischen Farbfundusphotos herangezogen wurden. In der Kombinationsgruppe wurde bei 13,2 % der Patienten eine milde Form und bei 10,5 % der Patienten eine moderate Form der PDR festgestellt. Der Anteil an Patienten im Laserarm mit milder PDR (5,3 %) und moderater PDR (7,9 %) war geringer als im Kombinationsarm. Für eine eindeutige Aussage, ob eine PDR vorlag, wurde die Befundung der FLA Aufnahmen und der Fundusphotos nach ETDRS Report Nummer 12 [166] herangezogen. Eine PDR lag vor sobald entweder eine Neovaskularisation der Papille (NVD, mit D für *disc*) und/oder eine Neovaskularisation außerhalb der Papille (NVE, mit E für *elsewhere*) auf den FLA Aufnahmen und/oder den Fundusphotos vorlagen. Die Zentren gaben im Dokumentationsbogen eine leicht andere Einschätzung (2 Patienten) ab, als das Reading Center. So wurden in der Kombinationsgruppe von den Zentren bei 21 % der Patienten eine PDR diagnostiziert, vom Reading Center bei 24 %. In der Lasergruppe stimmten Reading Center und Zentrum in der Befundung überein (13 %). Grund für die Unterschiede ist möglicherweise der Erfahrungsgrad in der Bewertung der Bilder. Vermutlich waren die Neovaskularisationen zu klein, so dass die Zentren diese nicht erkannt haben.

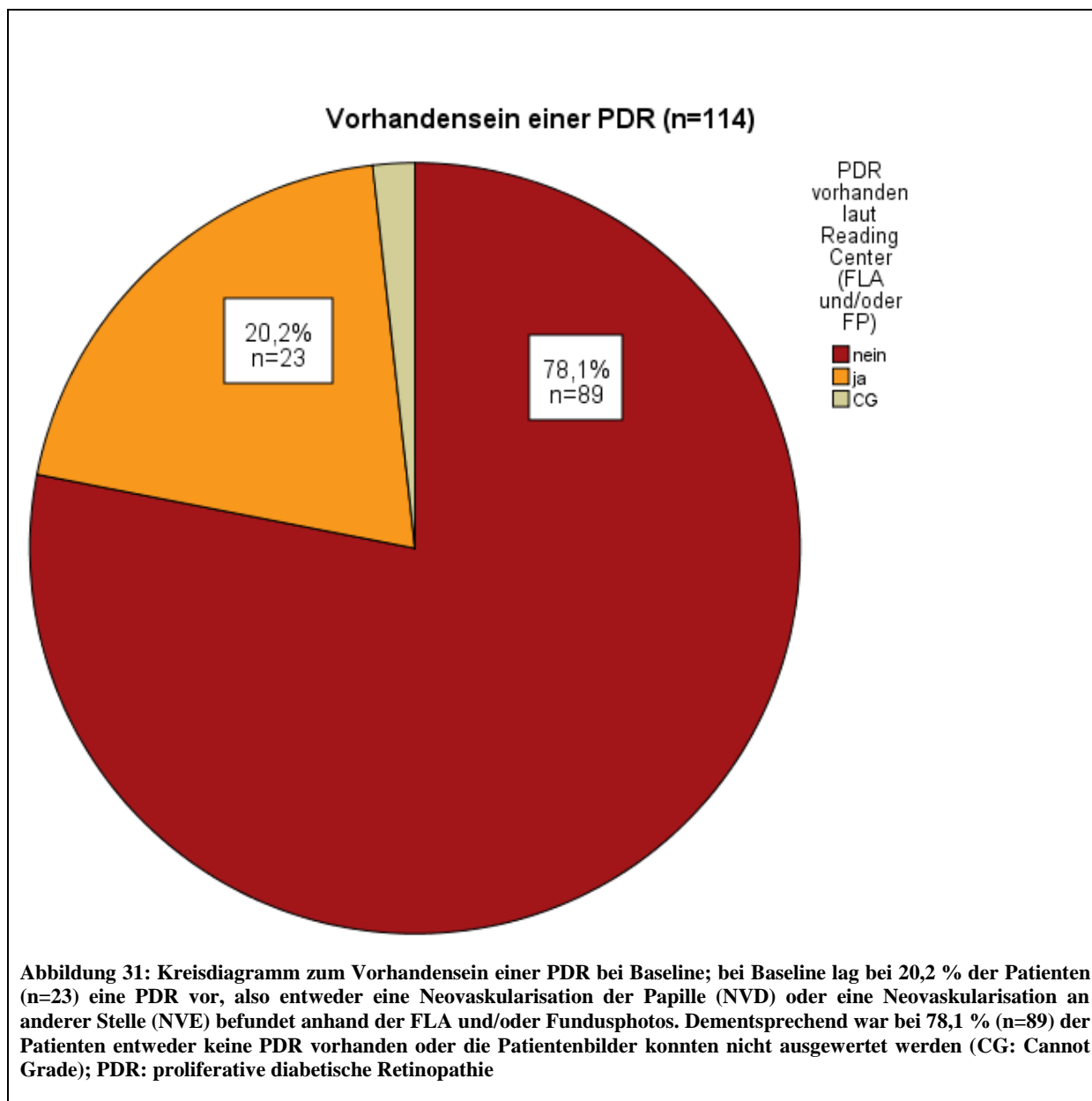
Bei 15 bzw. 16 % der Patienten lag ein fokales Makulaödem vor. Bei etwa 40 % wurde eine intermediäre Form des Makulaödems befundet und bei 40-43 % eine diffuse Form. Relativ viele Patienten waren vor Studienbeginn schon mit einer Laserkoagulation behandelt worden (71 % in der Kombinationsgruppe und 69 % in der Lasergruppe).

Die Baselinecharakteristika sind in den überwiegenden Fällen gleichmäßig auf die Behandlungsgruppen verteilt. Die zentrale Retinadicke bei Baseline war zwischen den Gruppen verschieden, aber nicht signifikant ( $p=0,059$ , t-Test bei unabhängigen Stichproben auf dem 5 % Signifikanzniveau). Obwohl in der Lasergruppe ein numerisch niedrigerer Anteil an Patienten mit PDR vorlag, war dieser ebenfalls nicht signifikant (exakter Test nach Fischer auf 5 % Niveau,  $p=0,224$ ).

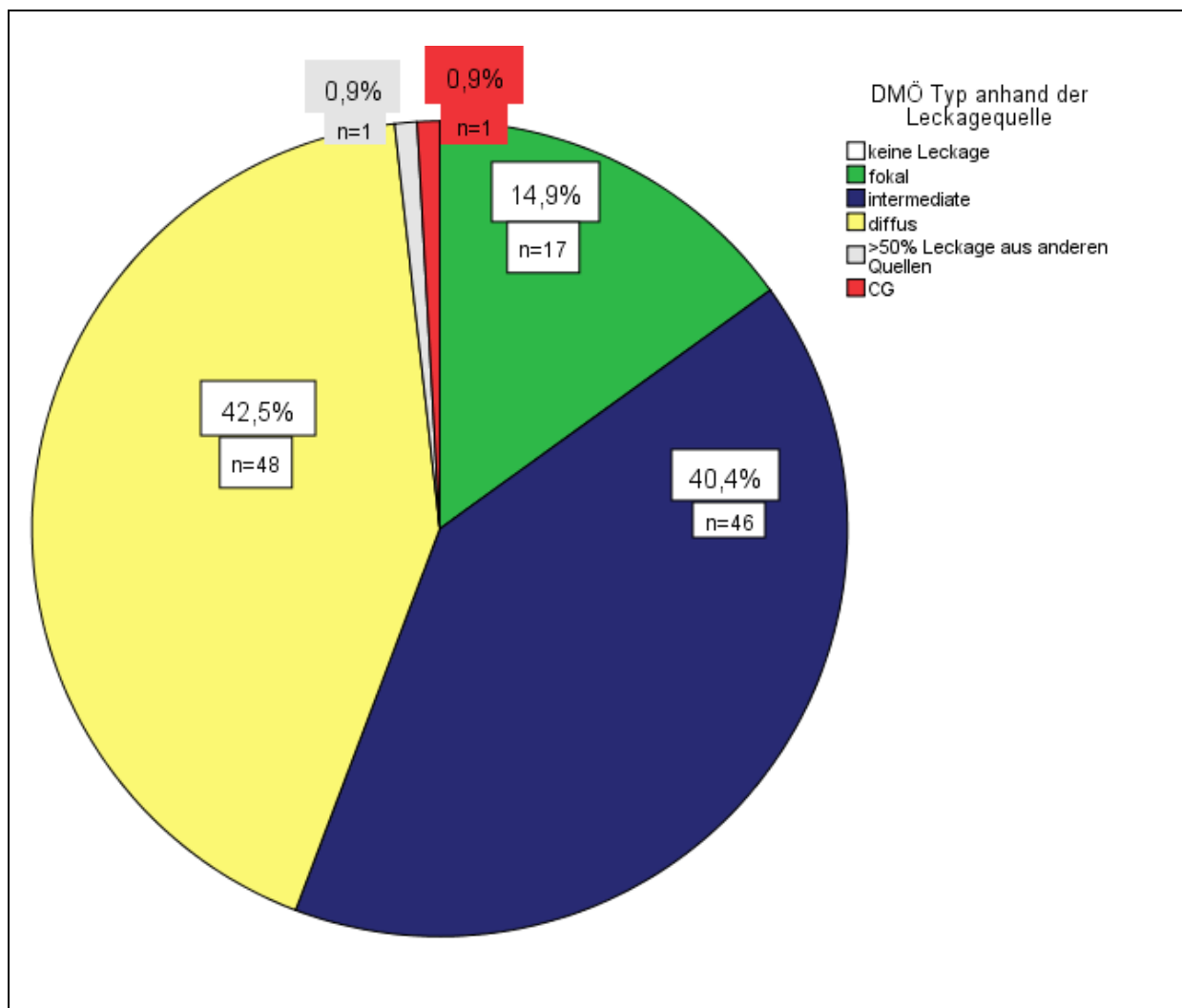


Bei den 114 Patienten verteilte sich das Retinopathiestadium wie in Abbildung 30 dargestellt. Bei 72,81 % der Patienten lag das Stadium NPDR (n=83) vor, bei 23 Patienten PDR. Davon hatten 12 Patienten (10,53 %) eine milde Form und 11 Patienten (9,65 %) eine moderate Form der PDR. 7 Patienten konnten nicht ausgewertet werden (6,14 %) und bei 1 Patient (0,88 %) war fraglich, ob eine diabetische Retinopathie vorhanden war. Der Baselinevisus unterschied sich zwischen den Retinopathietypen nicht (Einfaktorielle ANOVA, p=0,969, n=107; CG Patienten ausgeschlossen).



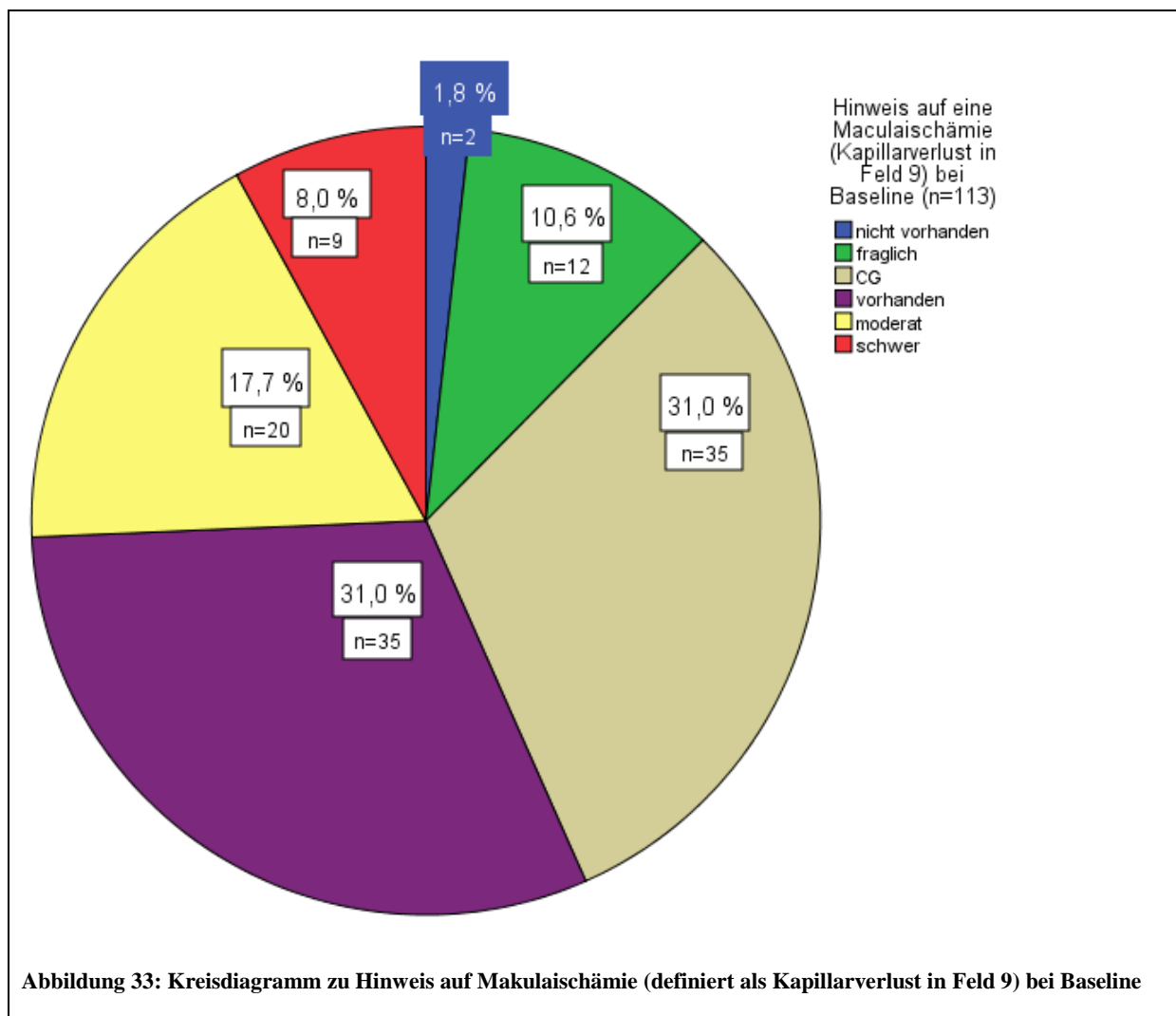


Eine PDR war vorhanden, wenn eine Neovaskularisation der Netzhaut vorlag und diese vom Reading Center mittels FLA oder FP bestimmt wurde. Dementsprechend hatten 20,2 % der Patienten eine PDR (n=23) und 78,1 % (n=89) keine PDR (siehe Abbildung 31). Bei 2 Patienten lagen dem Reading Center weder auswertbare FLAs noch FPs vor (1,8 % CG: cannot grade). Diese beiden Patienten hatten laut Angabe der Zentren keine PDR. Aber das kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Daher werden in den nachfolgenden Berechnungen nur die 112 Patienten mit eindeutiger Beurteilung herangezogen, sofern PDR betrachtet wird. Der Baselinevisus unterschied sich zwischen den Gruppen NPDR und PDR nicht (Einfaktorielle ANOVA-Analyse,  $p=0,798$ , bei  $n=112$ ).



**Abbildung 32: Kreisdiagramm zur Einteilung des DMÖ Typs bei Baseline anhand der Leckagequelle; bei 14,9 % (17 Patienten) wurde ein fokales MÖ diagnostiziert, bei 42,5 % (48 Patienten) eine diffuse Form und bei 40,4 % (46 Patienten) eine Mischform aus fokal und diffus. Jeweils 1 Patient hatte eine Leckage, die nicht von einem DMÖ hervorgerufen wurde oder konnte nicht ausgewertet werden (0,9%).**

Bei der Klassifizierung des DMÖ wurde neben der klassischen Einteilung nach fokalem und diffusem Makulaödem in der RELATION Studie vom Reading Center die Mischform (intermediate) mit berücksichtigt (Abbildung 32). Darüber hinaus gab es einen Patienten bei dem mehr als 50 % der Leckage aus einem anderen Grund hervorgerufen wurde (*confounding factors*) (Definitionen siehe Kapitel 2.1.12). Von einem Patienten konnte anhand der Bildbefunde keine Angabe zum Leckagetyp gemacht werden. In den weiteren Berechnungen wurden daher die 111 Patienten mit klar definiertem DMÖ (fokal, intermediate und diffus) berücksichtigt.



Vom Reading Center wurde außerdem das Feld 9 auf Kapillarverlust (Abbildung 33) untersucht. Nur bei 1,8 % (2) Patienten gab es keinen Hinweis auf eine Makulaischämie. Bei 10,6 % (12 Patienten) war das Vorhandensein fraglich und bei 31 % (n=35) konnte der Ischämiegrad anhand der vorliegenden Befunde nicht bestimmt werden. Bei 35 Patienten konnte eine Ischämie festgestellt werden (31 %). Bei 17,7 % (20) der Patienten lag eine moderate Makulaischämie vor, bei 8 % (9 Patienten) sogar eine schwere. Es gab keinen Zusammenhang zwischen Visus bei Baseline und dem Retinopathiestadium (Einfaktorielle ANOVA-Analyse,  $p=0,506$ ; ohne Berücksichtigung der Gruppe CG,  $n=78$ ).

### 3.1.2 Studiendauer und Behandlung

Da die Studie vorzeitig abgebrochen wurde, beendeten die Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten die Studie. Von den 114 Patienten schlossen 96 die Initialphase ab. Dementsprechend erreichten 18 Patienten die Erhaltungsphase nicht. In Tabelle 17 ist zusammengefasst wie lange die Patienten durchschnittlich in der Studie waren und wie sie behandelt wurden.

	Kombination	Laser	Gesamt
Anzahl Patienten, n	76	38	114
Anzahl Patienten, mit abgeschlossener Initialphase, n (%)	64 (84,21)	32 (84,21)	96 (84,21)
Anzahl Patienten, mit nicht abgeschlossener Initialphase, n (%)	12 (15,79)	6 (15,79)	18 (15,79)
Durchschnittliche Anzahl abgeschlossener Visiten $\pm$ SD [Minimum bis Maximum]	8,38 $\pm$ 2,76 [3 bis 13]	8,37 $\pm$ 2,58 [3 bis 13]	8,38 $\pm$ 2,69 [3 bis 13]
Durchschnittliche Anzahl Injektionen $\pm$ SD	5,38 $\pm$ 1,88	5,58 $\pm$ 2,20	5,45 $\pm$ 1,99
Durchschnittliche Anzahl Injektionen in Erhaltungsphase $\pm$ SD	1,46 $\pm$ 1,76	1,68 $\pm$ 2,08	1,54 $\pm$ 1,87
Durchschnittliche Anzahl DMÖ Laser $\pm$ SD	1,38 $\pm$ 0,65	1,34 $\pm$ 0,70	1,37 $\pm$ 0,66
Durchschnittliche Anzahl PDR Laser-Sessions laut CRF (n=6) $\pm$ SD	1,80 $\pm$ 1,78 (5 Patienten)	7 (1 Patient)	2,67 $\pm$ 2,66 (6 Patienten)

**Tabelle 17: Visitenverteilung und Anzahl der Behandlungen; SD: Standardabweichung; DMÖ: diabetisches Makulaödem; PDR: proliferative diabetische Retinopathie**

Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 3 bis maximal 13 Visiten, wobei der Durchschnitt bei 8,4 Visiten lag, was 6 Monaten entspricht. Das heißt die Patienten erhielten mindestens eine Injektion/Scheininjektion bis zu den maximal 12 möglichen. Während des Beobachtungszeitraums wurden durchschnittlich 5,4 Injektionen mit Ranibizumab und 5,6 Scheininjektionen durchgeführt. In beiden Gruppen wurde annähernd 1,4-mal gelasert. Der Unterschied beim PDR-Laser lässt sich folgendermaßen erklären: Der panretinale Laser verteilt sich immer auf mehrere Sitzungen. Bei den Patienten im Kombinationsarm wurde teilweise nur die erste Sitzung dokumentiert und dann lediglich die Gesamt-Herdanzahl angegeben. Bei dem Patienten im Laserarm wurde aber jede einzelne Sitzung separat dokumentiert. So kommt die unterschiedliche Anzahl der Sessions zustande. Bemerkenswert ist jedoch, dass alle Patienten mit PDR laut Prüfplan einen panretinalen Laser hätten bekommen müssen. Lediglich 6 der 21 Patienten, die vom Zentrum als PDR Patienten eingestuft wurden, erhielten einen panretinalen Laser. Daher kann man nur sehr bedingt Aussagen zum zusätzlichen Einsatz von panretinalem Laser bei den DMÖ Patienten treffen.

Die Verteilung der Patienten auf die Visiten ist in Tabelle 18, Tabelle 19 und Tabelle 20 zu finden.

Visite	Kombi	Laser	Gesamt
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	1	3
4	4	2	6
5	6	3	9
6	10	3	13
7	9	5	14
8	9	5	14
9	9	6	15
10	8	5	13
11	6	3	9
12	6	3	9
13	7	2	9
14	0	0	0

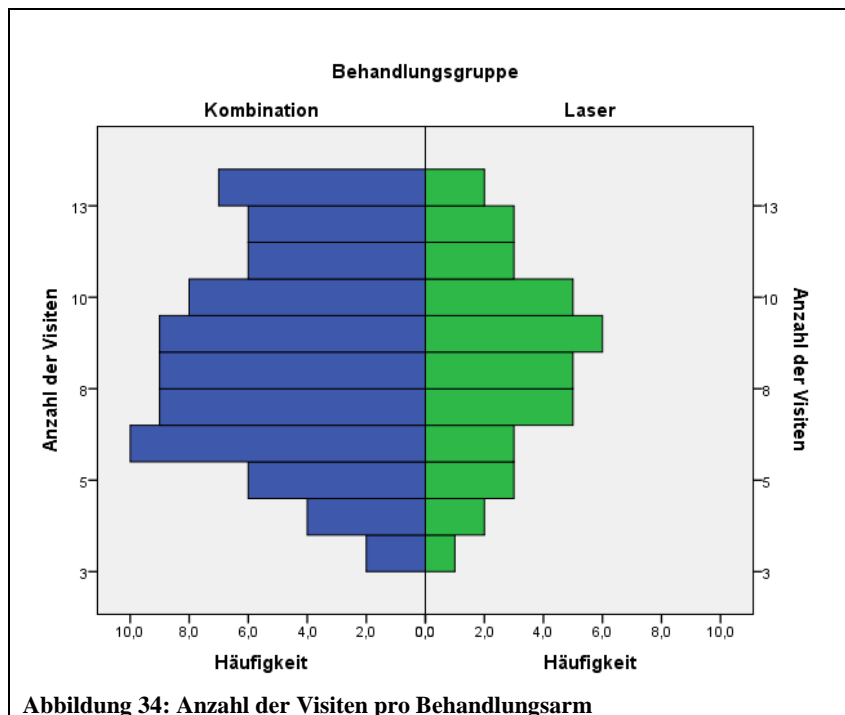
Tabelle 18: Verteilung der Patienten auf die Visiten zum Zeitpunkt des Studienabbruchs

Visite	Kombi	Laser	Gesamt
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	1	3
4	6	3	9
5	12	6	18
6	22	9	31
7	31	14	45
8	40	19	59
9	49	25	74
10	57	30	87
11	63	33	96
12	69	36	105
13	76	38	114
14	76	38	114

Tabelle 19: Kumulative Patientenzahl an den jeweiligen Visiten zum Zeitpunkt des Studienabbruchs (entspricht Anteil der Patienten, die für die LOCF Methode herangezogen wurden, siehe Kapitel 3.1.3)

Visite		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Patienten, welche die Visite zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen hatten	Kombi (n)	76	76	76	74	70	64	54	45	36	21	19	13	7	0
	Laser (n)	38	38	38	37	35	32	29	24	19	13	8	5	2	0
	Gesamt (n)	114	114	114	111	105	96	83	69	55	40	27	18	9	0

Tabelle 20: Verteilung der Patienten bei Abschluss der Studie nach bereits absolvierten Visiten



In Abbildung 34 ist die Verteilung der Patienten über die Visiten als Balkendiagramm aufgetragen. Mit Hilfe des Diagramms lässt sich schnell feststellen, dass die Anzahl der durchgeführten Visiten pro Behandlungsarm in etwa gleich verteilt war. Die Häufigkeit der Visiten ist im Kombinationsarm höher, da eine 2:1 Randomisierung der Patienten in den Kombinationsarm vorgenommen wurde.

### 3.1.3 LOCF-Methode

Wegen des Studienabbruchs wurde zur Berechnung der Endpunkte die für solche Fälle übliche LOCF (last observation carried forward) Methode benutzt. Bei dieser Methode wird der letzte gemessene Wert für jede nachfolgende Visite bis Visite 14 übernommen. Ist also z.B. der letzte Visuswert an Visite fünf dokumentiert worden, wird dieser für die Visiten sechs bis vierzehn angenommen und für sämtliche Berechnungen verwendet. Es stehen also an jeder Visite 114 Werte zur Verfügung. Das führt dazu, dass Änderungen bei späteren Visiten nicht mehr so stark ins Gewicht fallen und Schwankungen von Visus und Retinadicke durch immer weniger Patienten hervorgerufen werden. Da es keine Patienten gab, welche die Visite 14 erreicht hatten, entsprechen die Werte von Visite 13 den der Visite 14.

### 3.1.4 Visusendpunkte

#### 3.1.4.1 Primärer Endpunkt und Visusverlauf

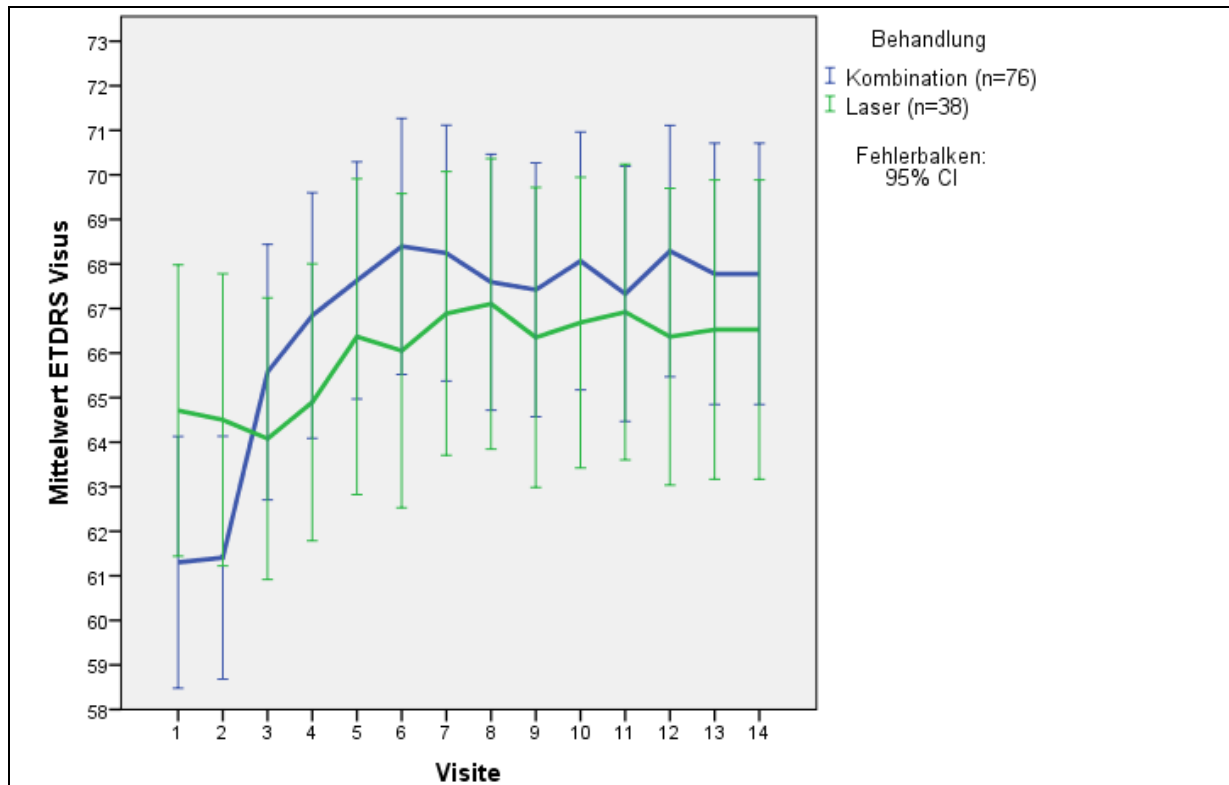
Die primäre Fragestellung der RELATION Studie war, ob sich die mittlere Änderung des Visus von Baseline zu Visite 14 zwischen den Behandlungsgruppen signifikant unterscheidet. Für die 114 Biomarker-Patienten zeigte sich bei der Kombinationsgruppe ein deutlicher Anstieg im Visus nach Beginn der Behandlung an Visite zwei (siehe Tabelle 21). Mit 68,39 Buchstaben lag der maximale Visus in der Kombi Gruppe bei Visite sechs vor. In der Lasergruppe wurde ein Visus von 67,11 Buchstaben erreicht, wobei der Baseline Visus in der Lasergruppe deutlich höher war, als in der Kombinationsgruppe. Die maximale Visusänderung ab Baseline in der Kombinationsgruppe war mit 6,99 ETDRS Buchstaben Gewinn an Visite sechs. In der Lasergruppe zeigte sich nur ein geringer Visusanstieg ab Baseline: bei Visite 8 lag mit 2,61 ETDRS Buchstaben Gewinn der maximale Anstieg der BCVA während des Beobachtungszeitraums vor. Mit dem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben wurde die Hypothese getestet, ob die absolute Visusänderung gegenüber Baseline zwischen den Therapiegruppen auf dem 5 % Niveau gleich ist. Schon ab Visite 3, also bereits nach nur einer Injektion, kann diese These abgelehnt werden. Das heißt, dass schon nach einer Injektion ein signifikanter höherer Visusgewinn in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Lasergruppe erreicht wurde.

LOCF	Visusverlauf (ETDRS Buchstaben), Mittelwerte ± SD [n <sup>#</sup> ]				Visusänderung gegenüber Baseline (ETDRS Buchstaben) Mittelwerte ± SD [n <sup>#</sup> ]				p-Wert zum Gruppenunterschied				
	Kombination (n=76)		Laser (n=38)		Kombination (n=76)		Laser (n=38)						
Vis. 1	61,3	± 12,37	[76]	64,71	± 9,95	[38]	-	[76]	-	[38]			
Vis. 2	61,41	± 11,92	[76]	64,5	± 9,98	[38]	-	[76]	-	[38]			
Vis. 3*	65,57	± 12,47	[76]	64,08	± 9,61	[38]	3,91	± 8,26	[76]	-0,42	± 6,16	[38]	0,005
Vis. 4	66,84	± 12,06	[74]	64,89	± 9,46	[37]	5,43	± 7,45	[74]	0,39	± 5,64	[37]	<0,001
Vis. 5	67,63	± 11,65	[70]	66,37	± 10,79	[35]	6,22	± 8,20	[70]	1,87	± 5,55	[35]	0,004
Vis. 6	68,39	± 12,57	[64]	66,05	± 10,73	[32]	6,99	± 8,06	[64]	1,55	± 6,91	[32]	0,001
Vis. 7 <sup>+</sup>	68,24	± 12,39	[54]	66,89	± 9,41	[29]	6,64	± 7,97	[54]	0,89	± 12,96	[29]	0,013
Vis. 8	67,59	± 12,57	[45]	67,11	± 9,92	[24]	6,18	± 8,36	[45]	2,61	± 6,69	[24]	0,024
Vis. 9 <sup>#</sup>	67,42	± 12,47	[36]	66,35	± 10,10	[19]	6,01	± 8,39	[36]	0,11	± 13,03	[19]	0,012
Vis. 10	68,07	± 12,67	[27]	66,68	± 9,93	[13]	6,66	± 8,64	[27]	2,18	± 7,50	[13]	0,008
Vis. 11	67,33	± 12,53	[19]	66,92	± 10,10	[8]	5,92	± 8,42	[19]	2,42	± 7,70	[8]	0,034
Vis. 12	68,29	± 12,35	[13]	66,37	± 10,13	[5]	6,88	± 9,20	[13]	1,87	± 7,68	[5]	0,005
Vis. 13	67,78	± 12,83	[7]	66,53	± 10,22	[2]	6,37	± 8,78	[7]	2,03	± 7,60	[2]	0,011
Vis. 14	67,78	± 12,83	[0]	66,53	± 10,22	[0]	6,37	± 8,78	[0]	2,03	± 7,60	[0]	0,011

Tabelle 21: Visusverlauf und Visusänderung bezogen auf Baseline: Mittelwerte und Standardabweichung beider Gruppen mit LOCF: last observation carried forward; SD: Standardabweichung

\*Im Kombiarm nur 75 Patienten; <sup>+</sup>Im Kombiarm nur 74 Patienten; im Laserarm nur 36 Patienten <sup>#</sup>Im Laserarm nur 37 Patienten; Der Gruppenunterschied wurde mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei Mittelwertgleichheit auf dem 5 % Signifikanzniveau berechnet. Die Varianzen der Mittelwerte waren gleich verteilt (Levene-Test der Varianzgleichheit bei allen Stichproben, 5 % Niveau).

<sup>#</sup>In eckigen Klammern dargestellt ist die Anzahl der Patienten, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Studie abgebrochen hatten. Generell werden aber auf Grund der LOCF-Methode immer 76 bzw. 38 Patienten für die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung herangezogen.



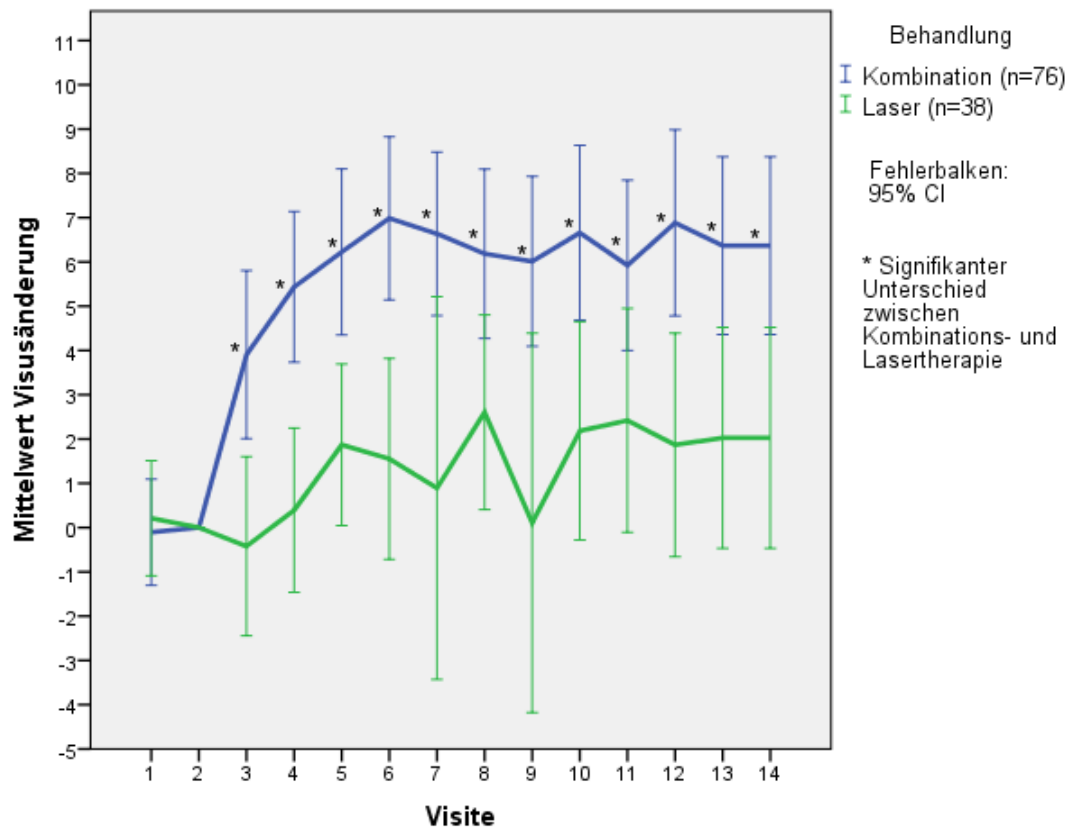
Visite	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Kombi (n<sup>#</sup>)</b>	76	76	76	74	70	64	54	45	36	21	19	13	7	0
<b>Laser (n<sup>#</sup>)</b>	38	38	38	37	35	32	29	24	19	13	8	5	2	0
<b>Gesamt (n<sup>#</sup>)</b>	114	114	114	111	105	96	83	69	55	40	27	18	9	0

Abbildung 35: Visusverlauf der Patienten aufgeteilt in die Behandlungsarme

<sup>#</sup>Dargestellt ist die Anzahl der Patienten, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Studie abgebrochen hatten, LOCF (last observation carried forward) Methode (siehe Kapitel 3.1.3).

In der Darstellung der Visusentwicklung über die Zeit (Abbildung 35) ist eine deutliche Visuszunahme bis etwa Visite 6 in der Kombinationsgruppe (n=76) zu erkennen. Danach ändert sich der Visus nur mehr geringfügig. In der Lasergruppe (n=38) nimmt der Visus in geringerem Umfang als im Kombiarm zu und bleibt ab Visite 7 ohne relevante Änderung. Da der Visus der Patienten in der Kombigruppe deutlich niedriger ist, bietet sich eine Darstellung an, bei welcher die Visusänderung ab Baseline aufgetragen wird (Abbildung 36).





Visite	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Kombi (n#)</b>	76	76	76	74	70	64	54	45	36	21	19	13	7	0
<b>Laser (n#)</b>	38	38	38	37	35	32	29	24	19	13	8	5	2	0
<b>Gesamt (n#)</b>	114	114	114	111	105	96	83	69	55	40	27	18	9	0

Abbildung 36: Änderung des Visus bezogen auf den Baselinevisus (Visite 2) in den Behandlungsarmen mit LOCF (last observation carried forward) Methode (siehe Kapitel 3.1.3)

Durch diese Darstellung (Abbildung 36) wird der signifikant stärkere Anstieg des Visusgewinns im Kombinationsarm gegenüber dem Laserarm ersichtlich. Der Visusanstieg in der Kombinationsgruppe hat an Visite sechs sein Maximum (Ende der Initialphase). Danach ist die Plateauphase erreicht und der Visus ändert sich nur mehr geringfügig. In der Lasergruppe gibt es einen geringeren Anstieg ab Baseline auf 2,6 Buchstaben. Bis auf einen Visusabfall um zwei Buchstaben bei Visite neun, ist auch in der Lasergruppe die Plateauphase bei circa zwei Buchstaben Gewinn erreicht.

Behandlung	Mittelwert (ETDRS Buchstaben)	Standard- abweichung	Anzahl der Patienten
Kombination	6,25	8,78	73
Laser	1,81	7,58	37
Gesamt	4,75	8,61	110

Tabelle 22: Visusergebnisse der ANCOVA Analyse mit Berücksichtigung der Faktoren Zentrum, Behandlung, DMÖ-Typ (fokal/intermediär/diffuse), PDR vorhanden (ja/nein) und Baseline BCVA; ETDRS: early treatment diabetic retinopathy study

Bei der ANCOVA Analyse des primären Endpunkts (Visus Unterschied zwischen Baseline und Visite 14) wurden als Kovariaten die Faktoren Zentrum, Behandlung, DMÖ-Typ (fokal/intermediär/diffus), PDR vorhanden (ja/nein) und Baseline BCVA berücksichtigt (Tabelle 22).

Dabei ergab sich in der Kombinationsgruppe ein ähnlicher Visusgewinn gegenüber Baseline als ohne Berücksichtigung der Kovariaten, nämlich  $6,25 \pm 8,76$  ETDRS Buchstaben (ohne ANCOVA:  $6,37 \pm 8,78$ ). Berechnet man den Visusunterschied zwischen Baseline und Visite 14 in der Lasergruppe unter Berücksichtigung der Kovariaten, so erhält man einen niedrigeren Visusunterschied von 1,81 Buchstaben ( $\pm 7,58$ ) im Gegensatz zu 2,03 Buchstaben ohne Berücksichtigung der Kovariaten. Einen signifikanten Einfluss auf den primären Endpunkt hatte der Visus an Visite 2 (Baseline) ( $p < 0,001$ ), der DMÖ-Typ ( $p = 0,007$ ), sowie die Behandlungsgruppe ( $p = 0,012$ ) (siehe Tabelle 88 im Anhang). Patienten im Kombinationsarm mit fokalem Ödem scheinen am ehesten von einer kombinierten Therapie zu profitieren, gefolgt von Patienten mit Stadium *intermediate*, (siehe auch Kapitel 3.1.6.1). Die Kovariaten *Vorhandensein von PDR* und das Zentrum, an dem der Patient behandelt wurden, hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Visusänderung zwischen Baseline und Visite 14.

### 3.1.4.2 Visusgewinn in Kategorien

In Tabelle 23 aufgetragen ist der Anteil an Patienten pro Behandlungsgruppe, die bei Visite 14 bezogen auf Baseline:

- eine Visuszunahme erreichten,
- einen Visus größer 73 Buchstaben oder
- einen Gewinn oder Verlust von 15 Buchstaben oder mehr hatten.

	Kombination (n=76)	Laser (n=38)	p-Wert	Gesamt (n=114)
Patienten mit Visuszunahme (%)	75,9	42,1	0,085	69,3
Patienten mit Visus > 73 Buchstaben (%)	40,8	28,9	0,303	36,8
Patienten mit Gewinn von $\geq 15$ Buchstaben (%)	15,8	5,3	0,137	12,3
Patienten mit Verlust von $\geq 15$ Buchstaben (%)	1,3	2,6	1,000	1,8

Tabelle 23: Visuskategorien mit patientenrelevanten Ergebnissen sowohl aufgeteilt nach Behandlungsgruppen als auch im Gesamten betrachtet; berechnet mit dem 2-seitigen, exakten Fisher-Test; LOCF-Methode

Im Kombinationsarm trat numerisch häufiger der Fall *Visuszunahme* ein als in der Lasergruppe (75,9 vs. 42,1 %,  $p = 0,085$ , alle getestet mit dem zweiseitigen, exakten Fisher-Test auf dem 5% Signifikanzniveau). Auch beim Anteil der Patienten mit mehr als 73 Buchstaben an Visite 14 und einem Gewinn von mehr als 15 Buchstaben lag eine Tendenz zu Gunsten der Kombinationstherapie vor. Für die Berechnung der Gruppen wurde immer die LOCF-Methode benutzt.

Neben den im Prüfplan geforderten *Visuskategorien* wurden explorativ noch weitere Gruppen betrachtet. Es folgt die Auflistung der Patienten mit einem Gewinn bzw. Verlust von 5 und 10 Buchstaben (Tabelle 24).

	Kombination (n=76)	Laser (n=38)	p-Wert	Gesamt (n=114)
Patienten mit Gewinn von > 5 Buchstaben (%)	46,1	31,6	0,161	41,2
Patienten mit Gewinn von > 10 Buchstaben* (%)	30,3	10,5	0,021*	23,7
Patienten mit Visusverlust** (%)	19,7	31,6	0,170	23,7
Patienten mit Verlust $\geq$ 5 Buchstaben (%)	3,9	13,2	0,115	7,0
Patienten mit Verlust $\geq$ 10 Buchstaben (%)	2,6	5,3	0,600	3,5

**Tabelle 24: Weitere Visuskategorien für alle Patienten inkl. Aufteilung in die Behandlungsgruppen, LOCF-Methode; \*signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppe; \*\*Visusverlust: Patienten, die unter den Ausgangsvisus fallen**

Auch bei diesen Kategorien setzt sich der Trend zu Gunsten der Kombinationstherapie fort, wobei eine Kategorie sogar einen signifikanten Gruppenunterschied zeigt. Mit dem 2-seitigem, exaktem Fisher-Test auf dem 5 % Signifikanzniveau gerechnet, stellt sich heraus, dass signifikant mehr Patienten im Kombinationsarm 10 Buchstaben gewinnen ( $p=0,021$ ).

Bei den weiteren Kategorien liegt es vermutlich an der Fallzahl, dass die Kombinationsgruppe zwar Tendenzen zu größeren Erfolgen, aber keine Signifikanzen hin zu günstigeren Ergebnissen zeigt.

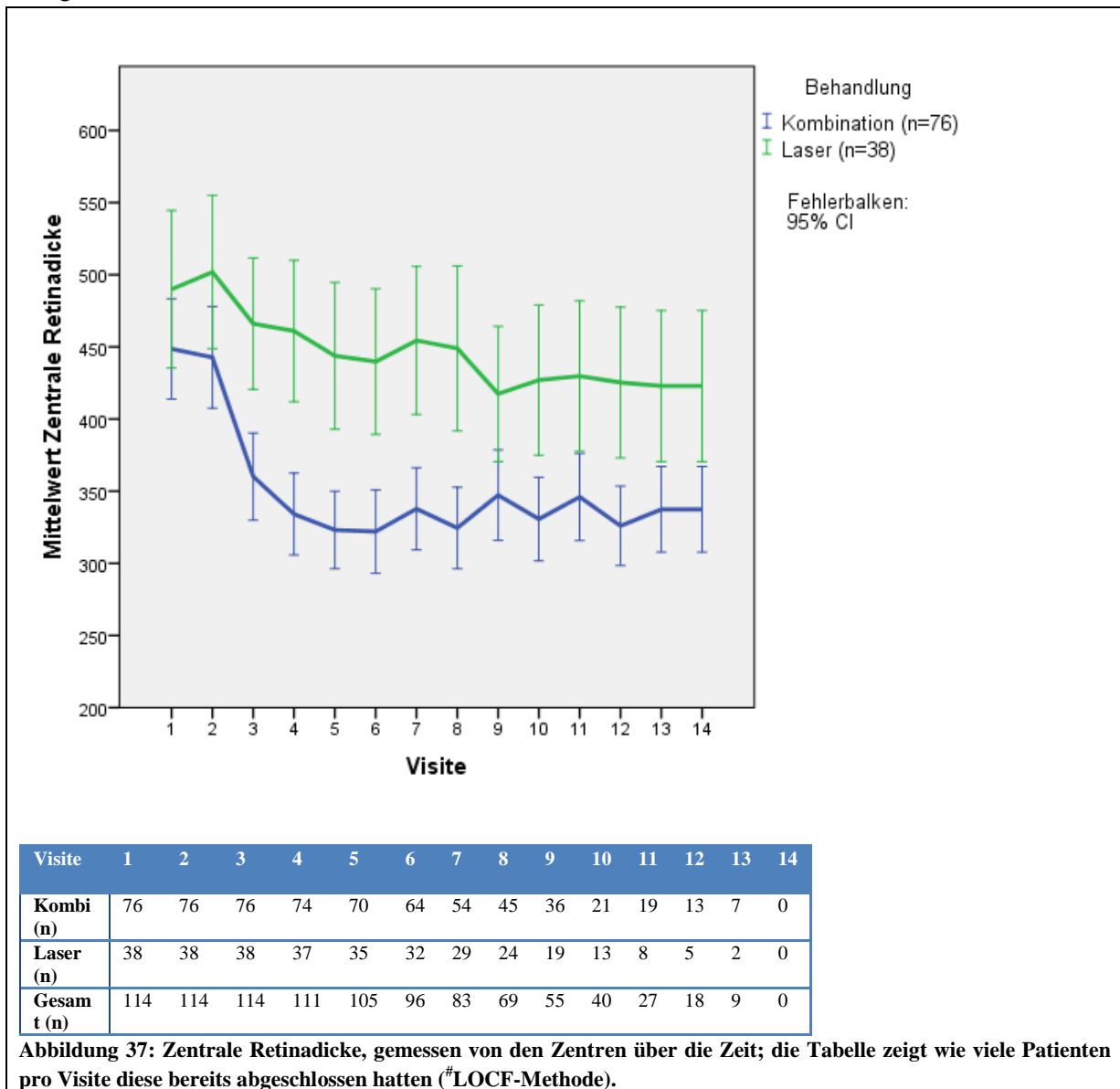
### 3.1.5 Entwicklung der Retinadicke

Bei den Ausgangswerten der Retinadicke ist zu beachten, dass bei Baseline ein Unterschied von 59  $\mu\text{m}$  zwischen Kombinations- und Lasergruppe vorlag. Die Patienten in der Lasergruppe hatten bei Visite 2 eine Retinadicke von 502  $\mu\text{m}$ , wohingegen die Retina bei den Patienten in der Kombinationsgruppe flacher war (443  $\mu\text{m}$ ). Die Patienten in der Lasergruppe haben also eine höhere Wahrscheinlichkeit auf deutliche Reduktion der Netzhautdicke als Patienten im Kombinationsarm (siehe Tabelle 25).

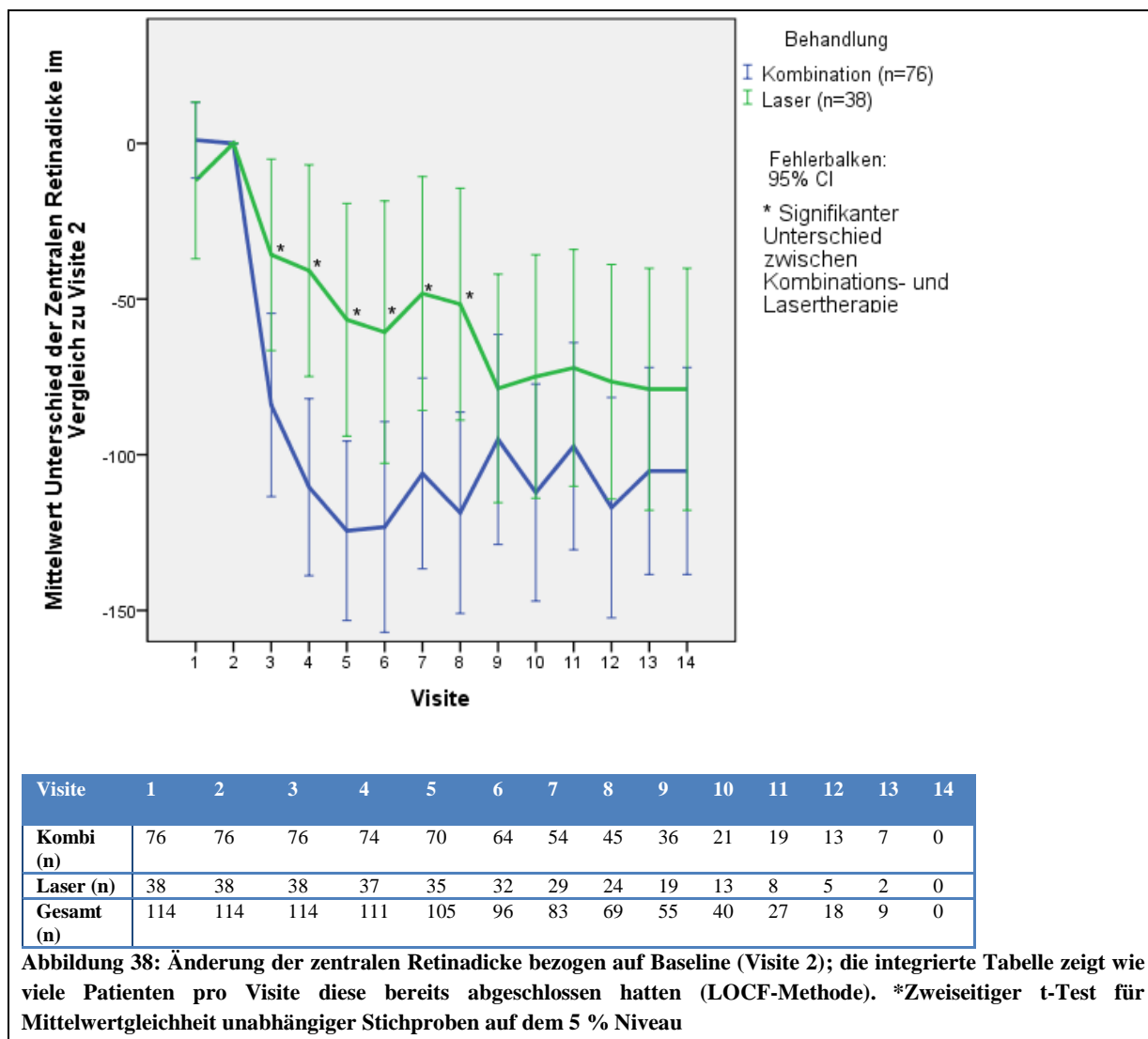
LOCF	Durchschnittliche zentrale Retinadicke [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ SD und Anzahl der Patienten, mit abgeschlossener Visite [n <sup>#</sup> ]				Abnahme der durchschnittlichen Retinadicke gegenüber Baseline [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ SD und Anzahl der Patienten mit abgeschlossener Visite [n <sup>#</sup> ]				p-Wert zum Gruppenunterschied				
	Kombination (n=76)		Laser (n=38)		Kombination (n=76)		Laser (n=38)						
Vis. 1 <sup>+</sup>	448,6	$\pm$ 151,28	[76]	490,0	$\pm$ 166,18	[38]	-	[76]	-	[38]			
Vis. 2 <sup>+</sup>	442,7	$\pm$ 152,07	[76]	501,9	$\pm$ 161,65	[38]	-	[76]	-	[38]			
Vis. 3 <sup>+</sup>	360,2	$\pm$ 131,21	[76]	466,1	$\pm$ 138,46	[38]	84,0	$\pm$ 126,09	[76]	35,8	$\pm$ 93,53	[38]	0,040
Vis. 4	334,1	$\pm$ 124,29	[74]	461,0	$\pm$ 148,89	[37]	110,4	$\pm$ 122,62	[74]	40,9	$\pm$ 103,33	[37]	0,003
Vis. 5 <sup>+</sup>	323,1	$\pm$ 115,16	[70]	443,8	$\pm$ 152,54	[35]	124,4	$\pm$ 121,72	[70]	56,7	$\pm$ 112,09	[35]	0,006
Vis. 6 <sup>+</sup>	322,1	$\pm$ 125,53	[64]	439,8	$\pm$ 151,49	[32]	123,2	$\pm$ 145,91	[64]	60,6	$\pm$ 126,31	[32]	0,028
Vis. 7 <sup>+</sup>	337,8	$\pm$ 123,09	[54]	454,5	$\pm$ 151,62	[29]	106,0	$\pm$ 130,36	[54]	48,2	$\pm$ 111,00	[29]	0,025
Vis. 8 <sup>+</sup>	324,5	$\pm$ 123,63	[45]	449,0	$\pm$ 171,48	[24]	118,7	$\pm$ 139,51	[45]	51,7	$\pm$ 111,64	[24]	0,012
Vis. 9 <sup>+</sup>	347,3	$\pm$ 137,26	[36]	417,4	$\pm$ 140,62	[19]	95,1	$\pm$ 145,48	[36]	78,7	$\pm$ 110,04	[19]	0,547
Vis. 10	330,7	$\pm$ 126,74	[27]	427,0	$\pm$ 158,24	[13]	112,2	$\pm$ 150,40	[27]	74,9	$\pm$ 118,98	[13]	0,187
Vis. 11	346,0	$\pm$ 131,23	[19]	429,8	$\pm$ 158,66	[8]	97,3	$\pm$ 142,60	[19]	72,1	$\pm$ 115,72	[8]	0,350
Vis. 12	326,0	$\pm$ 120,56	[13]	425,3	$\pm$ 158,90	[5]	117,0	$\pm$ 152,67	[13]	76,6	$\pm$ 114,63	[5]	0,154
Vis. 13	337,4	$\pm$ 129,73	[7]	422,9	$\pm$ 159,36	[2]	105,2	$\pm$ 143,45	[7]	79,0	$\pm$ 118,24	[2]	0,333
Vis. 14	337,4	$\pm$ 129,73	[0]	422,9	$\pm$ 159,36	[0]	105,2	$\pm$ 143,45	[0]	79,0	$\pm$ 118,24	[0]	0,333
*Änderung in der Gesamtzahl: Kombination: Visite 1,3,6,11 (n=75), Visite 2,7 (n=74), Visite 5 (n=73), Laser: Visite 5,6,8,9 (n=37)													
*signifikanter Unterschied zwischen Behandlungsgruppen													

Tabelle 25: Verlauf und Abnahme der zentralen Retinadicke inkl. p-Wert über die Visiten (zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau; LOCF-Methode); SD: Standardabweichung; <sup>#</sup>in eckigen Klammern dargestellt ist die Anzahl der Patienten, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Studie abgebrochen hatten.

In der Kombinationsgruppe wird die maximale Abnahme der Retinadicke schon an Visite 5 erreicht mit einem Unterschied zur Baseline von 124,44  $\mu\text{m}$  ( $\pm 121,722$ ). In der Lasergruppe wird bei Visite 13 der größte Unterschied zum Baselinewert gemessen mit 78,95  $\mu\text{m}$  ( $\pm 118,244$ ). Im Kombinationsarm ist durch die rasche Reduktion der Retinadicke auf Grund der zusätzlichen Gabe von Ranibizumab schon an Visite 3 ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festzustellen (zweiseitiger t-Test für Mittelwertgleichheit unabhängiger Stichproben auf dem 5 % Niveau, LOCF-Methode). Dieser Unterschied ist bis Visite 8 signifikant. Ab Visite 9 gibt es nur mehr einen numerischen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bei der Änderung der Retinadicke im Vergleich zum Baselinewert.



Die zentrale Retinadicke, die von den Zentren gemessen wurde, nimmt in der Kombinationsgruppe ab, bis etwa an Monat fünf eine Plateauphase erreicht wird (Abbildung 37). Auch bei den Laserpatienten reduziert sich die zentrale Retinadicke, wobei jedoch im Vergleich zur Kombinationsgruppe kein steiler Abfall erkennbar ist. Die Retinadicke bei Patienten der Lasergruppe erreicht erst an Visite neun eine Plateauphase.



Bezieht man alle Werte auf den Ausgangswert bei Baseline (Visite 2), kann man die Änderung der Retinadicke in den Gruppen besser vergleichen. Im Laserarm zeigt sich eine langsamere Reduktion der Retinadicke als im Kombiarm. In der Kombinationsgruppe ist eine rasche initiale Reduktion der Retinadicke um etwa 120 µm bis Visite 5 festzustellen (Abbildung 38). Ab Monat 9 ist der Unterschied zwischen den Studienarmen nicht mehr signifikant. Die verzögerte Wirksamkeit der Lasertherapie kann man im Verlauf der Retinadickenänderung sehr gut erkennen, wohingegen im Kombinationsarm nach der anfänglichen raschen Abnahme keine weiteren großen Änderungen der Retinadicke nach Visite 6 ersichtlich sind (siehe Abbildung 36).

### 3.1.6 Einfluss der Baselinecharakteristika auf die Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die wichtigsten Baselinecharakteristika und deren Auswirkung auf den Visusgewinn betrachtet.

#### 3.1.6.1 Betrachtung verschiedener DMÖ-Typen

Wie schon in der ANCOVA Analyse des primären Endpunkts festgestellt, macht es einen signifikanten Unterschied, welcher DMÖ Typ bei Therapiebeginn vorliegt (siehe Kapitel 3.1.4). In Tabelle 26 ist aufgetragen, wie sich die Visusänderung bezüglich der Ödemptypen verhält.

DMÖ Typ	Kombination			Laser		
	fokal	Intermediär	diffus	fokal	Intermediär	diffus
Anzahl der Patienten	11	30	33	6	16	15
Mittelwert Visusänderung zwischen Visite 2 und Visite 14 ± SD	12,55 ± 11,62	6,57 ± 6,36	4,18 ± 8,90	0,67 ± 3,72	2,63 ± 6,93	1,40 ± 9,49
Median der Visusänderung zwischen Visite 2 und Visite 14	10,00	5,50	3,00	-0,50	1,50	1,00
Varianz	135,07	40,46	79,15	13,87	47,98	89,97

**Tabelle 26: Verteilung der Visusänderung zwischen Visite 2 (Baseline) und Visite 14 bezüglich Mittelwert, Standardabweichung, Median und Varianz, aufgeteilt nach Therapiegruppe und DMÖ-Typ (LOCF-Methode); SD: Standardabweichung**

Die 11 Patienten mit fokalem Ödem profitierten signifikant stärker von der Kombinationstherapie, mit einem mittleren Visusgewinn von über 12 Buchstaben im Vergleich zum Laserarm ( $p=0,030$ , einfaktorielle ANOVA Analyse). Patienten mit intermediärem DMÖ gewinnen unter Kombinationstherapie mehr als 6 Buchstaben verglichen mit den Patienten der Lasergruppe (2,6 Buchstaben,  $p=0,059$ , einfaktorielle ANOVA Analyse). Patienten mit diffusem DMÖ Typ profitieren von einer Kombinationstherapie, jedoch ist der Visusgewinn mit 4 Buchstaben eher verhalten, aber numerisch höher als in der Lasergruppe (1,4 Buchstaben,  $p=0,330$ , einfaktorielle ANOVA Analyse).

Des Weiteren wurde getestet, ob der Ödemyt Einfluss auf das Therapieansprechen hat. Im Kombinationsarm zeigt sich ein signifikanter Einfluss des DMÖ Typs auf den Visusgewinn ( $p=0,021$ ; einfaktorieller ANOVA-Test). Im Gegensatz dazu scheint im Laserarm der DMÖ-Typ keine Rolle bei der Höhe des Visusgewinns zu spielen ( $p=0,841$ ; einfaktorieller ANOVA-Test).

### 3.1.6.2 Vorhandensein einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR)

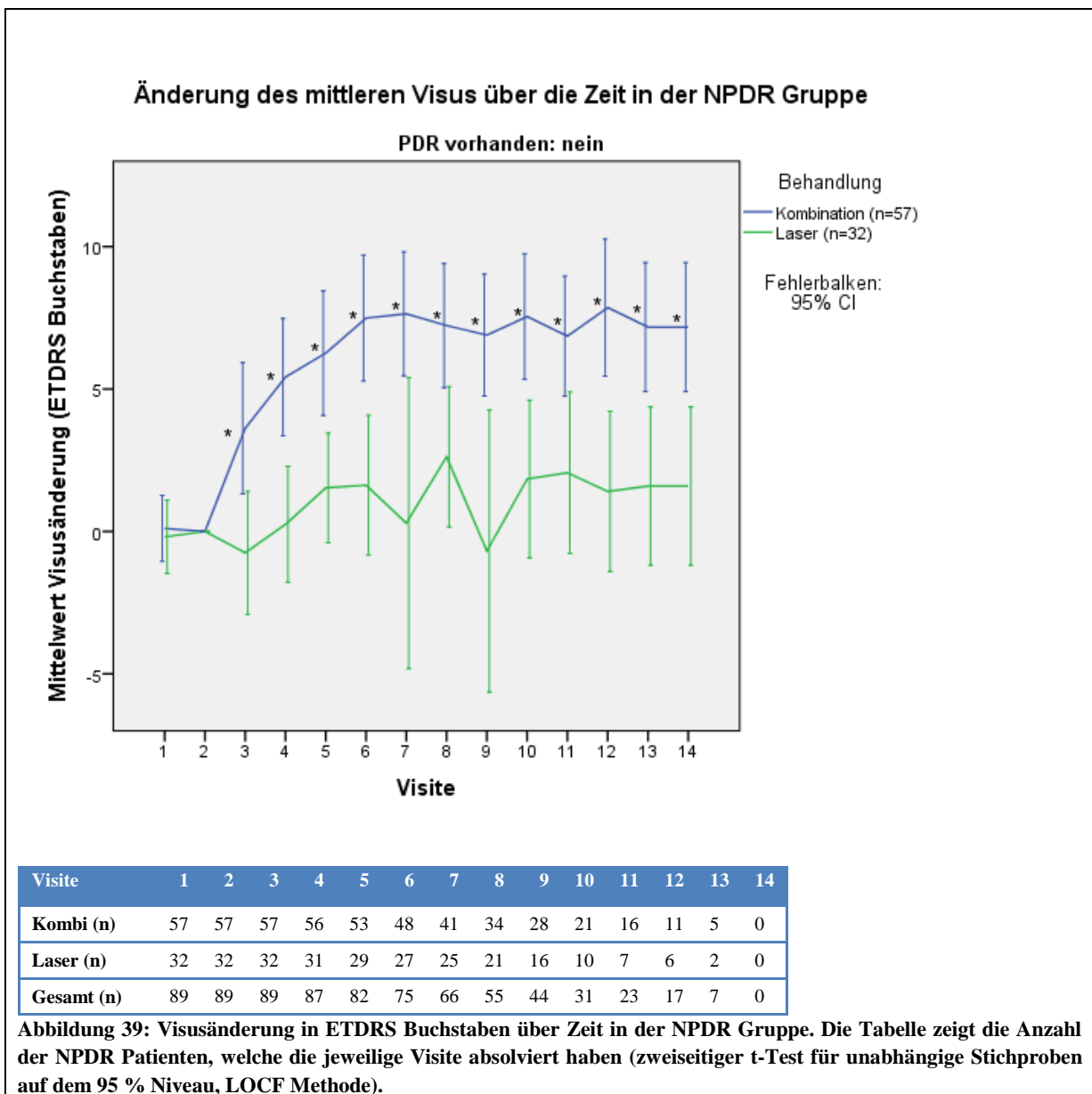
Im diesem Kapitel wird betrachtet, ob das Vorhandensein einer PDR Einfluss auf die Visusergebnisse hat. In Tabelle 27 werden Mittelwerte der Visusänderung von Baseline zu Monat 12 mit Standardabweichung, Median und Varianz gezeigt. Die Werte sind nach Therapieregime und Proliferationsstadium aufgeteilt. Die Untersuchung auf einen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen wurde mittels zweiseitigem t-Tests für unabhängige Stichproben auf dem 95% Niveau berechnet.

	NPDR		PDR	
	Kombi (n=57)	Laser (n=32)	Kombi (n=18)	Laser (n=5)
Mittelwerte der Visusänderung zwischen V2 und V14 ± SD	7,18 ± 8,54	1,59 ± 7,71	3,22 ± 8,98	3,20 ± 7,29
Median Visusänderung zwischen V2 und V14	5,00	1,00	3,50	3,50
Varianz	73,90	59,54	80,65	53,20
Zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben	p=0,003		p= 0,996	

	NPDR		PDR	
Mittelwerte der Visusänderung zwischen V2 und V6 ± SD	7,49 ± 8,34	1,63 ± 6,81	5,17 ± 7,23	3,00 ± 7,45
Median Visusänderung zwischen V2 und V6	7,00	2,00	4,50	3,00
Varianz	69,61	46,50	52,26	55,50
Zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben	p=0,001		p=0,562	

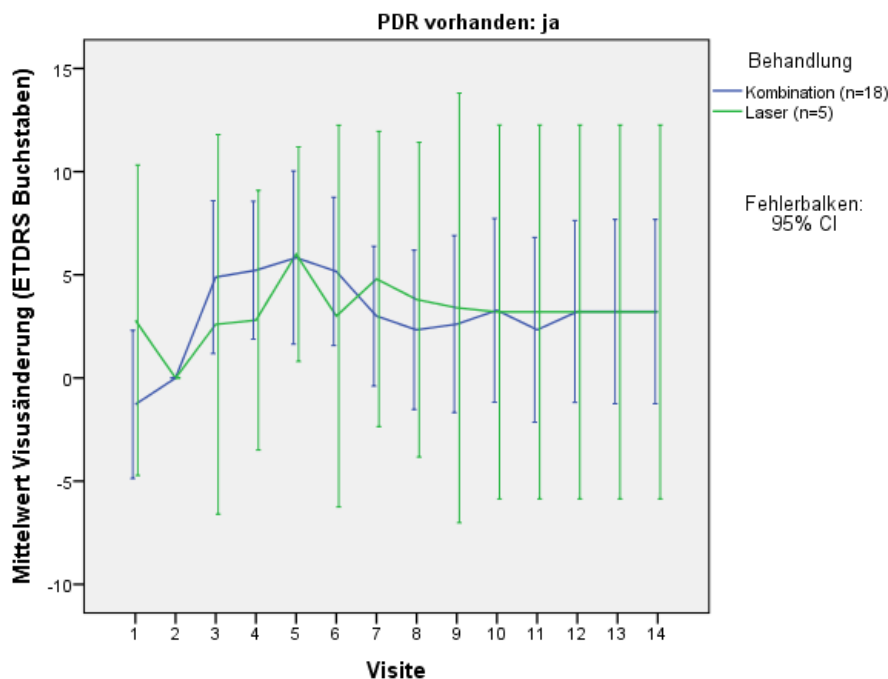
Tabelle 27: Überblick über die Visusänderung zwischen Visite 1 und 14 bzw. 6 aufgeteilt nach Therapie und PDR-Status (LOCF-Methode); V1: Visite 1; V6: Visite 6; V14: Visite 14; PDR: proliferative diabetische Retinopathie; NPDR: nicht proliferative diabetische Retinopathie; SD: Standardabweichung

In Abbildung 39 und Abbildung 40 ist die Visusentwicklung der NPDR und PDR Patienten grafisch dargestellt.





### Änderung des mittleren Visus über die Zeit in der PDR Gruppe



Visite	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>Kombi (n)</b>	18	18	18	17	16	15	12	10	7	6	3	2	2	0
<b>Laser (n)</b>	5	5	5	5	5	4	3	2	2	2	0	0	0	0
<b>Gesamt (n)</b>	23	23	23	22	21	19	15	12	9	8	3	2	2	0

**Abbildung 40: Visusänderungen in ETDRS Buchstaben über die Zeit in PDR Gruppe. Die Tabelle gibt die Anzahl der Patienten wieder, die zur jeweiligen Visite in der Studie waren (LOCF Methode).**

Bei den Patienten ohne PDR liegt ab Visite 3 ein signifikanter Unterschied zwischen Laser- und Kombinationsgruppe vor. NPDR Patienten erreichen mit der Kombinationstherapie einen Buchstabenanstieg von  $7,18 \pm 8,54$  ab Baseline im Vergleich zu Patienten der Lasergruppe ( $1,59 \pm 7,71$  Buchstabengewinn ab Baseline). Ganz anders verhält es sich bei Patienten mit PDR. Bei beiden Behandlungsgruppen ist ein initialer Visusanstieg erkennbar. Jedoch entwickeln sich die Visuskurven sehr ähnlich, so dass an Visite 14 der Visusunterschied zu Baseline in der Kombinationsgruppe  $3,22 \pm 8,98$  Buchstaben und in der Lasergruppe  $3,20 \pm 7,29$  Buchstaben beträgt.

Der offensichtlich fehlende Unterschied zwischen Kombinations- und Laserbehandlung ist auffällig. Für einen besseren Vergleich der Patienten mit PDR sind im Anhang in Tabelle 90 und Tabelle 91 die Visus- und Retinadickenentwicklung zusammengefasst und kommentiert. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse der Visusänderungen bezogen auf Baseline der PDR Patienten zusammengefasst. Bei der Interpretation muss man bedenken, dass nur 5 Patienten in die Lasergruppe randomisiert wurden. Dementsprechend hoch sind die Standardabweichungen.

Pat-Nr.	Behandlung	Δ V2 & V3	Δ V2 & V4	Δ V2 & V5	Δ V2 & V6	Δ V2 & V7	Δ V2 & V8	Δ V2 & V9	Δ V2 & V10	Δ V2 & V11	Δ V2 & V12	Δ V2 & V13	Δ V2 & V14
25004	Kombi	0	-4	-3	4	-3	-17	-17	-17	-17	-17	-17	-17
48006	Kombi	-4	-9	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11
41002	Kombi	-12	0	-1	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
48005	Kombi	-3	-5	-1	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3
12004	Kombi	12	12	6	14	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
14004	Kombi	2	3	2	1	5	2	2	3	-4	4	1	1
26001	Kombi	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
26005	Kombi	4	4	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3
34002	Kombi	22	10	29	12	*	3	3	3	3	3	3	3
5005	Kombi	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5006	Kombi	3	9	10	4	6	5	4	4	4	4	4	4
19001	Kombi	10	14	9	14	4	4	4	5	5	5	5	5
59002	Kombi	4	5	3	5	7	7	7	7	7	7	7	7
6001	Kombi	7	5	6	7	2	8	2	8	-1	7	10	10
6006	Kombi	2	13	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12
24001	Kombi	11	6	11	10	12	9	14	14	13	13	13	13
14012	Kombi	7	12	12	10	5	11	10	14	14	14	14	14
30002	Kombi	12	13	13	14	14	11	19	19	19	19	19	19
6004	Laser	5	-5	2	-8	-3	-3	-10	-7	-7	-7	-7	-7
5004	Laser	1	4	4	4	5	0	5	1	1	1	1	1
13003	Laser	-9	2	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3
21007	Laser	5	4	5	3	6	6	6	6	6	6	6	6
40001	Laser	11	9	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13

**Tabelle 28: Visusänderung (ETDRS Buchstaben) bezogen auf Baseline (Visite 2) der PDR Patienten sortiert nach Visusänderung beginnend mit negativer Visusänderung \*Wert fehlt: Visite fand nicht statt; Δ: Unterschied des bestkorrigierten Visus**

Von den 18 PDR Patienten im Kombiarm hatten 3 die Initialphase nicht abgeschlossen (je 1 an V3, V4, V5), in der Lasergruppe zwei (V2, V5). Darüber hinaus gab es 2 Patienten die im Kombinationsarm mehr als 10 Buchstaben verloren haben (11 und 17 Buchstaben), wobei Patient 25004 zwischendurch einen Visusgewinn hatte. Dieser Patient wurde an V6 nicht injiziert, aber an V7, verlor jedoch bis zur nächsten Visite weitere 14 Buchstaben. Es gibt keine unerwünschten Ereignisse, die diese Entwicklung erklären könnten. Bei Patient 48006 konnte die Initialphase wegen des frühen Studienendes nicht abgeschlossen werden. Es wurde nur zweimal mit zusätzlichem Ranibizumab behandelt, es ist also nicht auszuschließen, dass eine weitere Behandlung einen positiven Effekt auf den Visus gehabt hätte.

Bei drei Patienten in der Kombinationsgruppe schlug sich nieder, dass bei der Abschlussvisite ein deutlicher Verlust im Vergleich zur Vorgängervisite stattgefunden hatte (19001, 34002 und 12004). Hier hätte womöglich ein Wiederaufnehmen bzw. Weiterbehandeln einen erneuten Visusgewinn zur Folge gehabt. In den Lasergruppen waren die Visusunterschiede zu Baseline gering. Bis auf Patient 6004, der stark verlor und Patient 40001, der stark profitierte, waren keine nennenswerten Schwankungen ersichtlich.

Grundsätzlich muss der Effekt der Ranibizumab-Therapie bei PDR-Patienten in weiteren klinischen Prüfungen untersucht werden, da die Patientenzahl in der RELATION Studie zu gering ist um eindeutige Aussagen zu treffen.

Nachfolgend werden die Unterschiede der Messung der zentralen Netzhautdicke in den Kategorien Behandlungsgruppe und Auftreten einer PDR betrachtet (Tabelle 29). Der Retinadickenunterschied zwischen Baseline und Visite 14 bzw. Baseline und Visite 6 ist unter Berücksichtigung der Subgruppe PDR ja/nein nicht signifikant. Jedoch sind sowohl in der NPDR- als auch in der PDR Gruppe eine numerisch stärkere Verdünnung der Retina unter Kombinationstherapie erkennbar. Der Grund für den Unterschied zwischen den Gruppen, könnte der stark differierende Ausgangswert der CRT sein. Ähnlich wie beim Visus führt möglicherweise auch die bessere Ausgangslage der Retinadicke bei Baseline zu geringeren Abnahmen in der Kombinationsgruppe unter Behandlung.

	NPDR		PDR	
	Kombi (n=56)	Laser (n=32)	Kombi (n=17)	Laser (n=5)
Mittelwert der Retinadicke bei Baseline [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ SD	443 $\pm$ 146,56	493,91 $\pm$ 156,69	423,59 $\pm$ 173,87	600,80 $\pm$ 155,93
Mittelwerte der Abnahme CRT zwischen V2 und V14 $\pm$ SD	101,20 $\pm$ 119,42	85,5 $\pm$ 121,89	116,94 $\pm$ 211,24	51,00 $\pm$ 107,69
Median der Abnahme CRT zwischen V2 und V14	64,00	69,50	79,00	69,00
Varianz	21479,70	14858,26	44621,68	11598,00
Zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben	0,558		0,514	
Mittelwerte der Abnahme CRT zwischen V2 und V6 $\pm$ SD	116,27 $\pm$ 139,66	60,32 $\pm$ 136,49	149,47 $\pm$ 170,22	72,40 $\pm$ 55,44
Median der Abnahme CRT zwischen V2 und V6	91,00	43,00	111,00	94,00
Varianz	19504,27	18628,56	28975,64	3073,30
Zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben	0,075		0,126 <sup>#</sup>	

Tabelle 29: Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung, Mediane und Varianz der Abnahme der Retinadicke und Ergebnis des zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben auf dem 0,05 Signifikanzniveau. \*an Visite 6 n=31; <sup>#</sup>im Gegensatz zu den anderen p-Werten dieser Tabelle sind bei diesem Test die Varianzen nicht gleich verteilt (Levene-Test auf Varianzgleichheit; p=0,42, LOCF-Methode); CRT: zentrale Retinadicke, von den Zentren gemessen; SD: Standardabweichung; (N)PDR: (nicht) proliferative Diabetische Retinopathie;

Die Baselinewerte der PDR-Patienten sind zwischen den Gruppen nicht gleichmäßig verteilt (Tabelle 30). Die Patienten im Laserarm sind durchschnittlich 6 Jahre jünger als die Patienten im Kombi-Arm, Diabetestyp und Geschlechteranteil verteilen sich gleichmäßig auf die Behandlungsgruppen.

		Kombi (n=18)	Laser (n=5)
<b>Alter (Mittelwert)</b>		59,06	53,06
<b>Typ 1 Diabetiker (%)</b>		16,67	25,00
<b>Geschlecht</b>	Anteil Frauen (%)	11,11	25,00
	Anteil Männer (%)	88,9	75,00
<b>HbA1c V1 (Mittelwert)</b>		7,19	6,92
<b>BCVA V2 (Mittelwert in Buchstaben, ± SD)</b>		63,44 (± 9,88)	56,00 (± 11,81)
<b>CRT V2 (Mittelwert in µm, ± SD)</b>		432,59 (± 173,87)	600,8 (± 155,93)
<b>PDR-Typ (%)</b>	Mild	55,60	40,00
	Moderat	44,40	60,00
<b>NVD V1 (%)</b>	keine	77,78	40,00
	fraglich	5,56	0,00
	auf FLA und FP	5,56	60,00
	auf FLA nicht FP	11,11	0,00
<b>NVE V1 (%)</b>	keine	5,56	40,00
	fraglich	0	0
	auf FLA und FP	27,78	40,00
	auf FLA nicht FP	66,67	0,00
	nicht auswertbar	0	20,00
<b>Makuläre Ischämie V1 (Verlust von Kapillaren in Feld 9*) (%)</b>	fraglich	11,11	0
	nicht auswertbar	33,33	0
	vorhanden	27,78	60,00
	Moderat	27,78	40,00
<b>DMÖ Typ</b>	Intermediär: n (%)	8 (44,4)	3 (60)
	Diffus: n (%)	9 (50,0)	2 (40)
	Nicht auswertbar: n (%)	1 (5,6)	0

Tabelle 30: Baseline und V1 Charakteristika der PDR Patienten aufgeteilt nach Behandlungsgruppen; V1: Visite 1; V2=Visite 2; Feld 9: zentrales Feld, das Makula und Papille zeigt; SD: Standardabweichung; FLA: Fluoreszenzangiographie; FP: Fundusphotographie; BCVA: best corrected visual acuity; CRT: central retinal thickness; DMÖ: Diabetisches Makulaödem

Es gibt einige Faktoren bei Baseline, die das schlechtere Abschneiden der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Lasergruppe erklären könnten. Zum Beispiel haben die Patienten im Kombiarm eine

schlechtere HbA1c-Einstellung. Darüber hinaus war der Baselinevisus bei Patienten im Kombinationsarm signifikant höher als bei Patienten im Laser Arm (zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben auf dem 0,05 Signifikanzniveau,  $p=0,166$ ). Und auch die bereits erwähnte zentrale Retinadicke weist einen deutlichen, wenn auch auf Grund der Fallzahl nicht signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf. Laserpatienten haben eine um mehr als 150  $\mu\text{m}$  stärker verdickte Retina bei Baseline verglichen mit Patienten in der Kombinationsgruppe (zweiseitiger t-Test unabhängiger Stichproben auf dem 0,05 Signifikanzniveau,  $p=0,067$ ). Bei PDR-Typ, Anteil der Patienten mit einer NVD, NVE oder makulärer Ischämie haben hingegen die Laserpatienten eine eher schlechtere Ausgangssituation. Das heißt die Patienten in der Lasergruppe haben NVDs, die wegen der Nähe zur Makula eher kritischer einzustufen sind im Gegensatz zu den weniger kritischen NVEs. Außerdem weisen Laserpatienten höhere Anteile vorhandener/moderater Ischämien auf. In der Kombinationsgruppe liegt ein höherer Anteil an unkritischen NVEs vor, die in der FLA, aber nicht auf den Fundusphotos sichtbar waren.

Wenn man die Baseline und V1 Charakteristiken der PDR Patienten betrachtet scheint es am wahrscheinlichsten, dass der Unterschied zwischen Baseline-Visus und Baseline-CRT der Grund für das fehlende Ansprechen auf Visus und CRT darstellt. Die Patienten im Kombinationsarm haben einen besseren Ausgangsvisus, daher eine geringere Wahrscheinlichkeit Buchstaben zu gewinnen als Laserpatienten. Bei der Retinadicke verhält es sich ähnlich.

### 3.1.6.3 Vorbehandlung mit Lasertherapie

Eine weitere interessante Fragestellung in der RELATION Studie ist, ob eine Vorbehandlung mit einer Lasertherapie in der Anamnese einen Einfluss auf die Visusergebnisse hat.

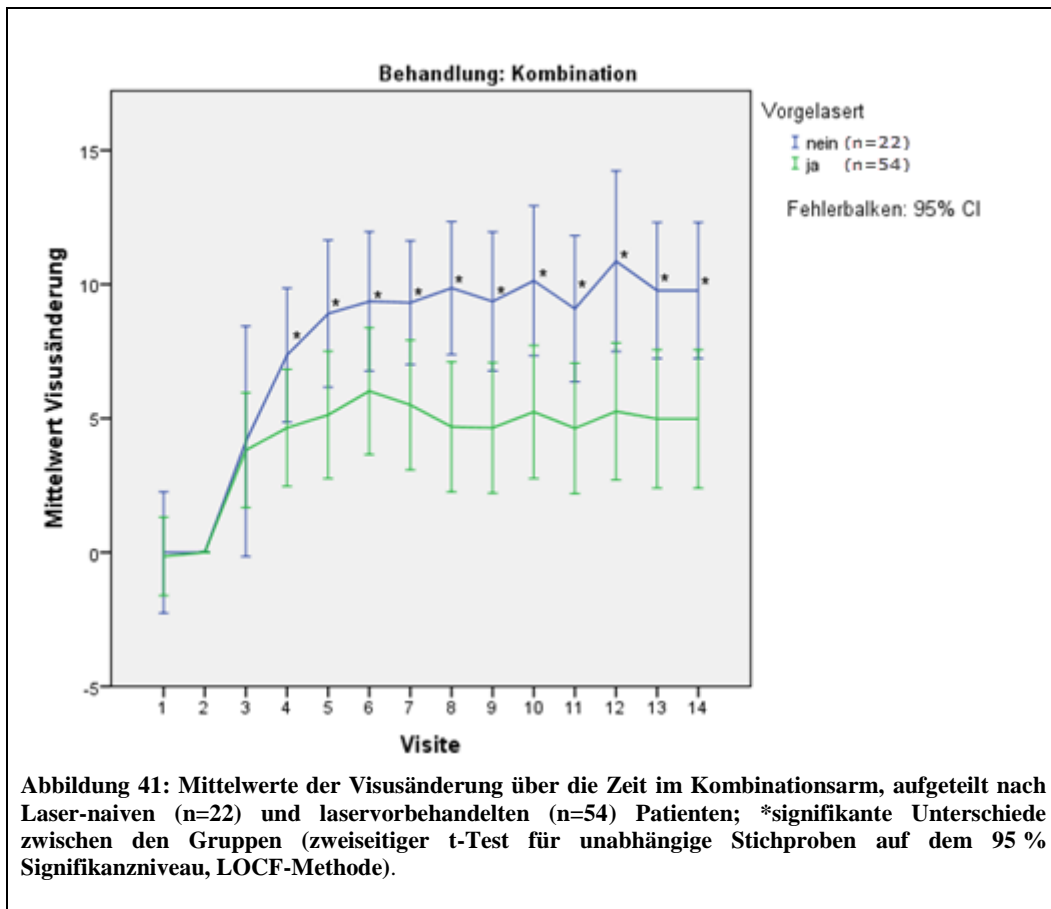
Vorbehandlung	Nein		Ja	
	Kombi (22)	Laser (13)	Kombi (54)	Laser (25)
Behandlung (n)				
Mittelwert des Visusunterschied zwischen Baseline und Visite 14 in Buchstaben $\pm$ SD	9,77* $\pm$ 5,72	3,00 $\pm$ 6,26	4,98 $\pm$ 9,45	1,52 $\pm$ 8,28
Zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben	P=0,003		P=0,120	

Tabelle 31: Subgruppenanalyse zur Vorbehandlung mit Lasertherapie vor Studienbeginn; getestet wurde mit dem zweiseitigen t-Test auf dem 95 % Signifikanz Niveau (LOCF-Methode). SD: Standardabweichung;

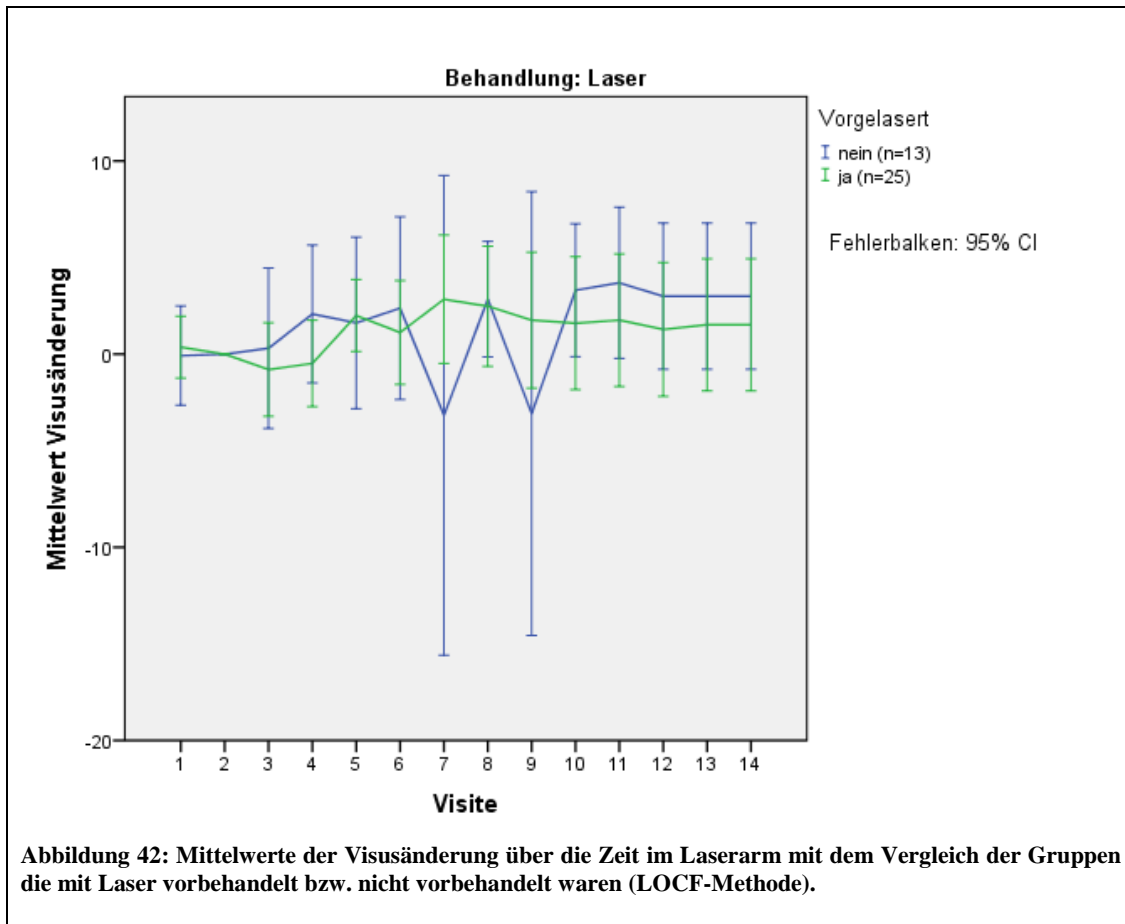
In einer Subgruppenanalyse (Tabelle 31) stellte sich heraus, dass mit Laser vorbehandelte Patienten in der Kombinationsgruppe zwar Visus gewinnen, aber bei weitem nicht das Potenzial von Laser naiven Patienten haben. Der Unterschied zwischen Kombi- und Lasertherapie bei vorbehandelten Patienten ist daher nicht signifikant ( $p=0,120$ ), auch wenn Patienten, die mit kombinierter Therapie behandelt wurden, numerisch etwas besser abschneiden.

In der Gruppe der nicht mit Laser vorbehandelten Patienten, gewannen die mit Kombitherapie behandelten Patienten signifikant mehr Buchstaben als Patienten, die mit Laser behandelt wurden (9,77 Buchstaben vs. 3,00 Buchstaben;  $p=0,003$  zweiseitiger t-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau). Vergleicht man die beiden Kombinationsgruppen miteinander, so erreichen die Laser-naiven Patienten einen signifikant höheren Visusanstieg nach 12 Monaten, als Patienten, die mit Laser vorbehandelt wurden ( $p=0,030$ ; zweiseitiger t-Test für unabhängige

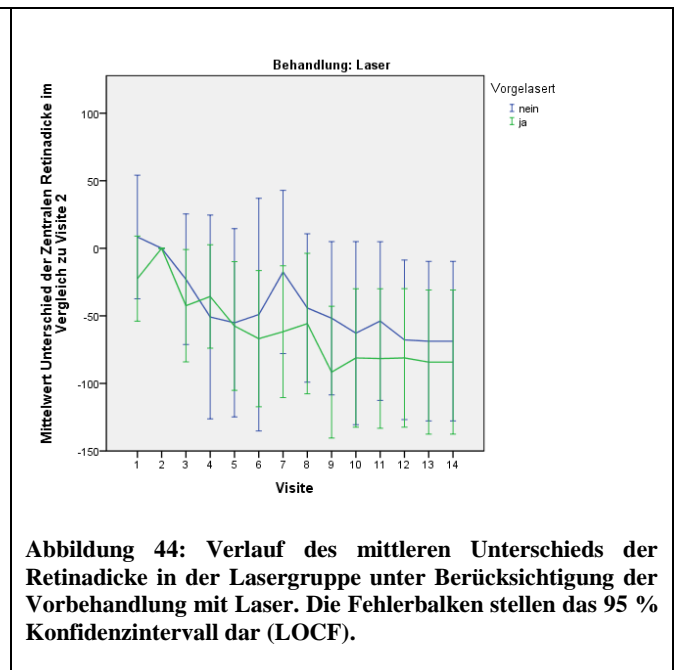
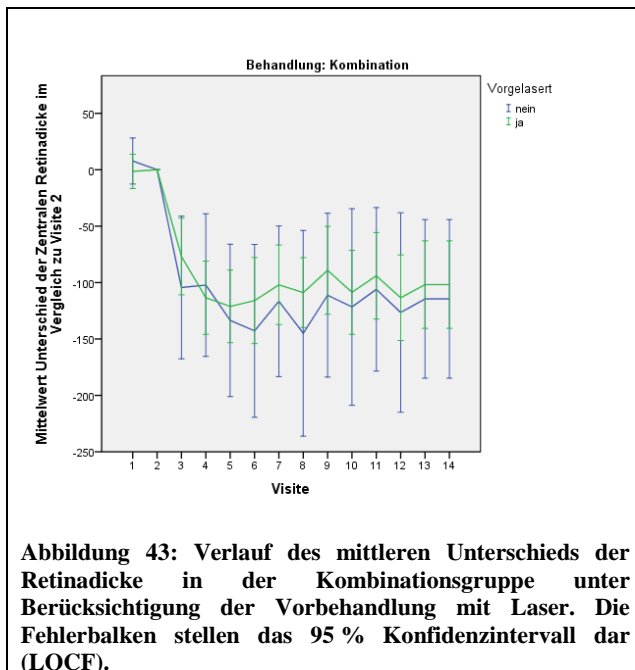
Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau). In Abbildung 41 sind die entsprechenden Visuskurven inklusive Angaben zu signifikanten Unterschieden dargestellt.



In der Lasergruppe ergeben sich keine Unterschiede zwischen den mit Laser vorbehandelten und Laser-naiven Patienten (Abbildung 42).



Für den Verlauf der zentralen Retinadicke unter Therapie spielte es interessanterweise keine Rolle ob Patienten schon vor Beginn der klinischen Prüfung mit Laser behandelt waren (Abbildung 43 und Abbildung 44).



Die Vorbehandlung mit Laser scheint also einen Einfluss auf das Visusergebnis zu haben. Dieser Effekt wurde in früheren Studien nicht berichtet, da vermutlich weniger Patienten mit Vorbehandlung

randomisiert wurden. Darum wurde der Faktor *Vorbehandlung mit Laser* in der ursprünglichen ANCOVA Analyse nicht berücksichtigt (siehe Kapitel 3.1.4). Es lohnt sich also den Visusgewinn mit der ANCOVA Analyse inklusive diesem Faktor noch einmal zu berechnen. Dabei zeigt sich aber keine Änderung der Visusergebnisse in den Gruppen wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Lediglich in den einzelnen Signifikanzen der Kovariaten zeigten sich leichte Unterschiede im Gegensatz zur vorherigen Analyse (siehe Tabelle 88 und Tabelle 89 im Anhang).

#### **3.1.6.4 Einfluss von makulärer Ischämie und Retinopathiestadium bei Baseline auf den Visusgewinn an Monat 12**

Weder im Kombinationsarm, noch im Laserarm hatte das Vorliegen einer makulären Ischämie Einfluss auf die Visusentwicklung (Einfaktorielle ANOVA-Analyse, Kombiarm:  $p=0,829$ , Laserarm:  $p=0,267$ ;  $n=78$ ). Der Visusgewinn verteilte sich darüber hinaus auch bezüglich Retinopathiestadien gleichmäßig auf die Therapiegruppen (einfaktorielle ANOVA-Analyse, Kombiarm:  $p=0,111$ , Laserarm:  $p=0,884$ ;  $n=107$ ).

#### **3.1.6.5 Zusammenfassung der klinischen Ergebnisse**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde zunächst der Einfluss der Therapien auf Visus und Retinadicke betrachtet. Ranibizumab in Kombination mit der Lasertherapie zeigte eine signifikante Überlegenheit gegenüber der alleinigen Lasertherapie. Die ANCOVA Analyse unter Berücksichtigung der Faktoren Zentrum, Behandlung, DMÖ-Typ, Vorhandensein von PDR und Baseline-Visus ergab einen mittleren Buchstabengewinn von 6,25 im Kombi-Arm im Vergleich zu 1,81 Buchstaben im Laserarm ( $p=0,012$ ). Die Retinadicke nahm deutlich schneller unter Kombinationstherapie ab, jedoch war nach 12 Monaten (LOCF) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (mittlere Abnahme der Retinadicke  $\pm$  Standardabweichung:  $105\mu\text{m} \pm 143\mu\text{m}$  im Kombinationsarm vs.  $79\mu\text{m} \pm 118\mu\text{m}$  im Laserarm). Zu beachten ist dabei der Baselinewert der Retinadicke. Die Patienten im Laserarm starten durchschnittlich deutlich schlechter ( $502\mu\text{m} \pm 162\mu\text{m}$ ), als Patienten im Kombinationsarm ( $443\mu\text{m} \pm 152\mu\text{m}$ ). Der Effekt der Kombinationstherapie könnte dadurch geringer erscheinen als der im Laserarm.

Des Weiteren wurde in den vergangenen Kapiteln der Einfluss verschiedener Baselinecharakteristika untersucht.

In der Kombinationsgruppe scheint der DMÖ-Typ einen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben ( $p=0,021$ ), in der Lasergruppe jedoch nicht. NPDR Patienten profitierten stärker von einer Kombinationstherapie als Laserpatienten (mittlerer Visusgewinn 7,18 vs. 1,59 Buchstaben,  $p=0,003$ ). Bei der Subgruppe der PDR-Patienten ( $n=23$ ) gab es keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Patienten, die nicht mit Laser vorbehandelt waren zeigten höhere Visusgewinne mit der Kombinationstherapie im Vergleich zur Lasertherapie (mittlerer Buchstabengewinn von 9,77 vs. 3,00,  $p=0,003$ ,  $n=35$ ). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen bei Vorbehandlung mit Laser (4,98 Buchstaben im Kombiarm vs. 1,52 Buchstaben im Laserarm,  $p=0,120$ ,  $n=79$ ). Vorbehandlung mit Laser hatte keinen Einfluss auf den primären Endpunkt (ANCOVA Analyse).

Die Visusentwicklung wurde nicht durch das Vorhandensein einer makulären Ischämie oder dem Retinopathiestadium bei Baseline beeinträchtigt.



### **3.1.7 Ergebnisse der Sicherheitsanalyse**

Die Tabellen mit den (schweren) unerwünschten Ereignissen, die im Laufe der RELATION Studie auftraten, sind aufgeteilt nach Behandlungsarm in Kapitel 8.3.4 gelistet.

Es traten einerseits unerwünschte Ereignisse auf, deren Herkunft in der diabetischen Grunderkrankung begründet sind oder typischen Begleiterkrankungen (z.B. diabetisches Fußsyndrom, Hypoglykämien oder Hypertonie). Andererseits wurden Ereignisse erfasst, die im Zusammenhang mit der intravitrealen Injektion bekannt sind (z.B. abnormes Gefühl im Auge, Augenschmerzen, trockenes Auge). Diese unerwünschten Ereignisse traten nicht häufiger auf als in der Fachinformation beschrieben (siehe aktuelle Lucentis® Fachinformation).

Darüber hinaus gab es auch zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeit der unerwünschten Ereignisse (2-seitiger exakter Fisher-Test).

Die Studie zeigte keine neuen Erkenntnisse zum Sicherheitsprofil von Ranibizumab. Zusammengefasst ist nach bisherigem Kenntnisstand die Kombinationstherapie aus Ranibizumab und Laser eine sichere Therapie bei Patienten mit DMÖ.

## **3.2 Untersuchung der Biomarker der RELATION Patienten**

Neben den typischen ophthalmologischen Untersuchungen wurden in der RELATION Studie Biomarkerproben an drei verschiedenen Zeitpunkten entnommen und untersucht. Vorgesehen war die Entnahme an Visite eins, sechs und 14. Bei Studienabbruch wurde die Visite 14 durchgeführt und somit auch Biomarkerproben entnommen. War diese letzte Visite zum Zeitpunkt der eigentlichen Visite sechs, wurde die Biomarkerprobe der Visite sechs zugeordnet, damit für diesen Zeitpunkt, an dem alle Patienten die Initialphase abgeschlossen hatten, möglichst viele einheitliche Werte vorlagen. Darüber hinaus wurden aus den V14 Werten zwei Untergruppen gebildet. Eine Gruppe enthielt alle Patienten, die zum Zeitpunkt des Studienabbruchs die Initialphase noch nicht abgeschlossen hatten (*Visiten 2-5 bzw. V2-V5*). Da diese Patienten die Anfangsserie von 4 aufeinanderfolgenden Ranibizumab/Schein-Injektionen noch nicht abgeschlossen hatten, ist es sinnvoll, diese als separate Gruppe zu betrachten. Die zweite Untergruppe bestand aus den Patienten mit Biomarkerproben nach Visite 6, die als Visite 14 zusammengefasst wurden.

Es folgen die tabellarischen Auswertungen der Biomarker behandlungsunabhängig bzw. aufgeteilt nach Behandlungsgruppen, sowie Boxplots der Biomarkerkonzentrationen.

Die Verteilung zwischen den Therapiegruppen an einer Visite wurde mit dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau berechnet. Der Unterschied der Biomarker zwischen den Visiten wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für verbundene Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau berechnet. Dafür wurden jedoch nur die Patienten miteinander verglichen, bei denen auch Follow-Up Untersuchungswerte vorlagen. In den Boxplots werden alle Patienten, die eine Visite absolviert haben, dargestellt. Die p-Werte zwischen den Visiten innerhalb einer Therapiegruppe beziehen sich auf die Patientenzahlen, die beide Visiten absolviert haben.

### 3.2.1 IL-8

In Tabelle 32 sind Mittelwert, Median, Standardabweichung, Varianz, Minimum, Maximum und die Quartile, also die Perzentile 25, 50 und 75 % der IL-8 Messung unabhängig der Behandlungsgruppe wiedergegeben. In Tabelle 33, werden die Messwerte auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt dargestellt.

IL-8 [pg/ml]	V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>	17,56	7,09	17,51	14,87
<b>Median</b>	12,14	6,53	10,37	11,26
<b>Standardabweichung</b>	36,73	6,48	38,11	19,80
<b>Varianz</b>	1348,81	42,00	1452,55	391,22
<b>Minimum</b>	0,96	0,96	0,96	0,96
<b>Maximum</b>	388,86	29,31	363,51	158,83
<b>Perzentile</b>	25	6,04	3,39	5,56
	50	12,15	6,53	10,37
	75	20,66	7,61	17,09

Tabelle 32: IL-8 Statistik

IL-8 [pg/ml]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	19,38	4,97	19,53	17,30	13,93	11,77	13,33	10,58	
<b>Median</b>	11,15	4,82	10,51	11,90	13,20	7,54	9,95	9,99	
<b>Standardabweichung</b>	44,37	2,61	45,63	23,96	10,43	10,03	12,32	7,07	
<b>Varianz</b>	1968,57	6,83	2082,05	574,01	108,68	100,62	151,72	50,02	
<b>Minimum</b>	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	4,82	0,96	0,96	
<b>Maximum</b>	388,86	9,04	363,51	158,83	39,82	29,31	50,17	29,21	
<b>Perzentile</b>	25	6,06	2,48	5,93	6,98	5,67	5,68	4,87	4,85
	50	11,15	4,82	10,51	11,90	13,20	7,54	9,95	9,99
	75	22,39	7,44	17,96	19,11	18,92	19,99	16,69	13,25

Tabelle 33: IL-8 Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte

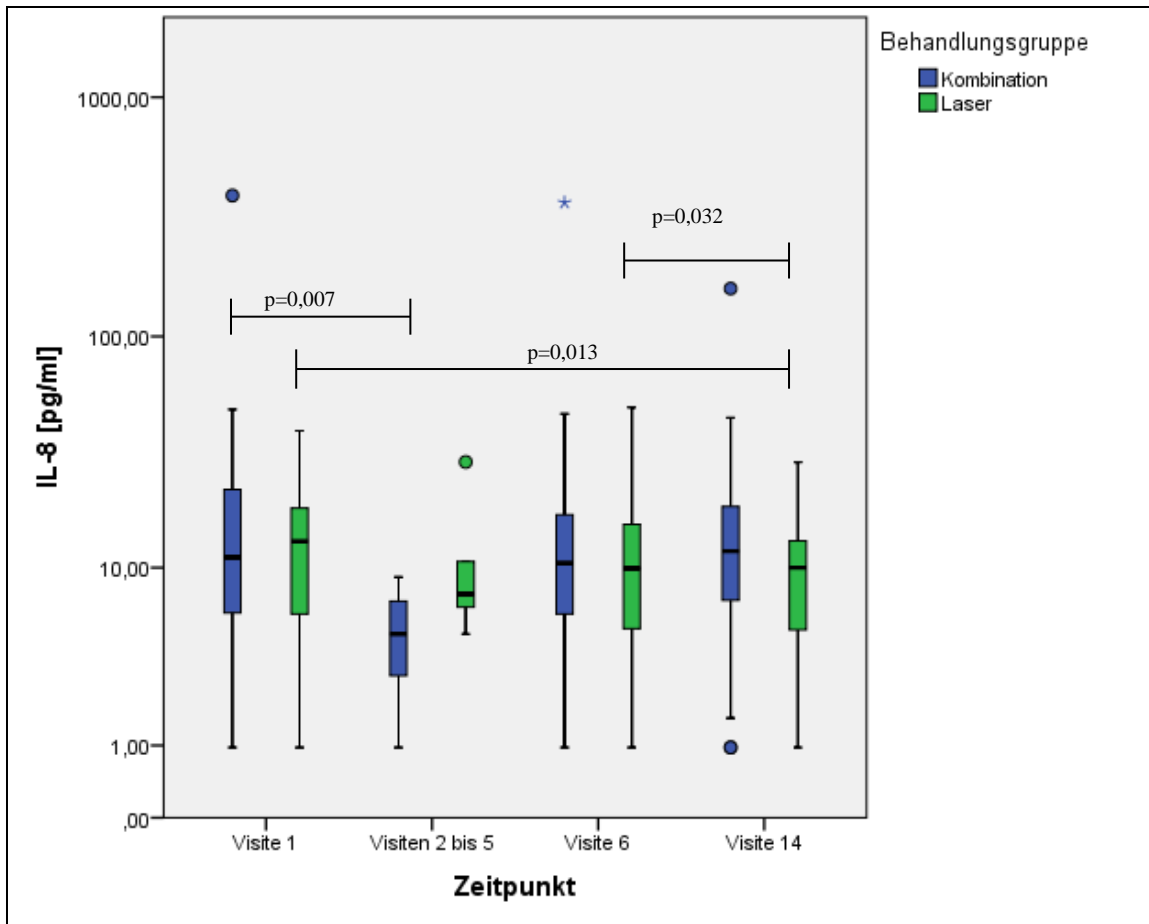


Abbildung 45: Logarithmische Auftragung in Boxplots der IL-8 Konzentrationen [pg/ml] über die Visiten mit Aufteilung nach Behandlungsgruppen. Balken in Boxplots entsprechen dem Median, Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Trägt man die gemessenen IL-8 Serum Konzentrationen aufgeteilt nach Therapie als Boxplots auf, erhält man Abbildung 45. Im Kombinationsarm ist die IL-8 Konzentration an der Sammelvisite (Visiten 2 bis 5) signifikant niedriger als an Visite 1 ( $p=0,007$ ). In der Lasergruppe ergibt sich ein signifikant niedrigerer IL-8 Wert an Visite 14 als an Visite eins ( $p=0,013$ ) und auch die Visite 14 Konzentration ist signifikant niedriger als die Visite sechs Konzentration ( $p=0,031$ ).

### 3.2.2 IL-10

In Tabelle 34 sind die Ergebnisse der Messungen und die daraus resultierenden Berechnungen von IL-10 aufgetragen. Diese sind in Tabelle 35 nach Behandlungsgruppe aufgeteilt, und in Abbildung 46 als Boxplots dargestellt. In der Lasergruppe gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der IL-10 Konzentration an Visite 1 und Visite 14 ( $p=0,002$ ).

IL-10 [pg/ml]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		4,58	2,90	4,78	3,80
<b>Median</b>		1,10	0,96	1,15	0,96
<b>Standardabweichung</b>		6,16	3,037	6,68	5,26
<b>Varianz</b>		38,00	9,22	44,64	27,65
<b>Minimum</b>		0,32	0,75	0,32	0,33
<b>Maximum</b>		34,57	8,22	32,89	36,69
<b>Perzentile</b>	25	0,75	0,96	0,75	0,93
	50	1,10	,96	1,15	,96
	75	7,29	6,04	6,49	6,75

Tabelle 34: IL-10 Statistik

IL-10 [pg/ml]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		4,22	2,74	5,14	3,76	5,29	3,25	4,02	3,76
<b>Median</b>		0,99	0,96	0,99	1,18	1,18	1,11	1,22	1,18
<b>Standardabweichung</b>		5,75	3,13	7,58	3,58	6,94	3,14	4,29	3,58
<b>Varianz</b>		33,07	9,79	57,44	12,81	48,22	9,89	18,39	12,81
<b>Minimum</b>		0,32	0,75	0,32	0,33	0,32	0,96	0,32	0,33
<b>Maximum</b>		33,90	8,22	32,89	11,54	34,57	7,58	12,81	11,54
<b>Perzentile</b>	25	0,78	0,96	0,75	0,91	0,75	0,96	0,75	0,91
	50	0,99	0,96	0,99	1,18	1,18	1,11	1,22	1,18
	75	7,17	6,17	6,67	7,21	9,98	6,61	6,88	7,21

Tabelle 35: IL-10 Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte

An allen anderen Visiten sind die IL-10 Mittelwerte in den Therapiegruppen gleichmäßig verteilt.

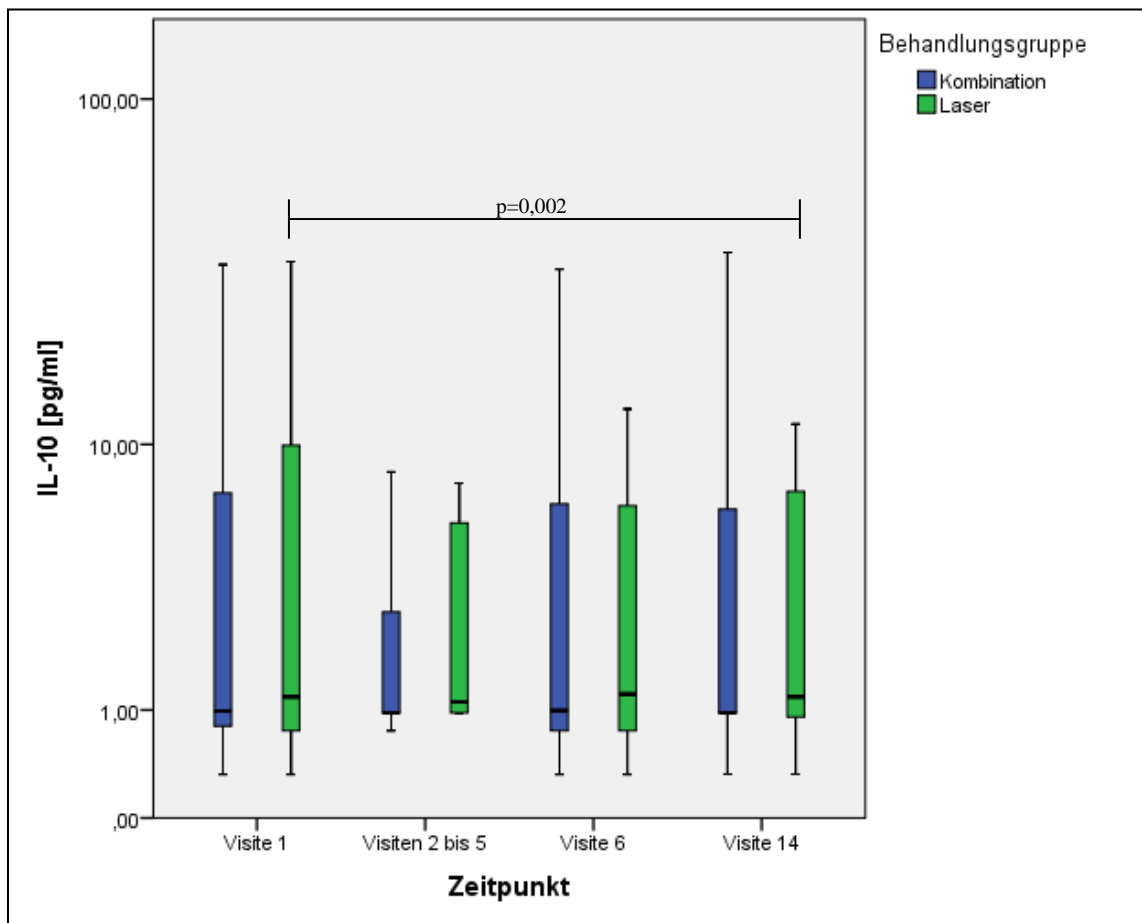


Abbildung 46: Boxplots der IL-10 Konzentrationen [pg/ml] über die Abnahmezeitpunkte mit Aufteilung nach Behandlungsgruppen.

### 3.2.3 IL-17A

Eine Übersicht zu den deskriptiven Daten der IL-17A Konzentrationen erhält man über Tabelle 36 und Tabelle 37.

IL-17A [pg/ml]	V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>	12,19	5,45	11,01	12,01
<b>Median</b>	0,49	0,33	0,55	0,33
<b>Standardabweichung</b>	52,66	10,60	60,33	41,56
<b>Varianz</b>	2772,89	112,30	3639,64	1727,11
<b>Minimum</b>	0,32	0,33	0,32	0,32
<b>Maximum</b>	543,64	38,13	573,59	289,59
<b>Perzentile</b>	25	0,33	0,33	0,33
	50	0,49	0,33	0,55
	75	5,20	7,42	3,25

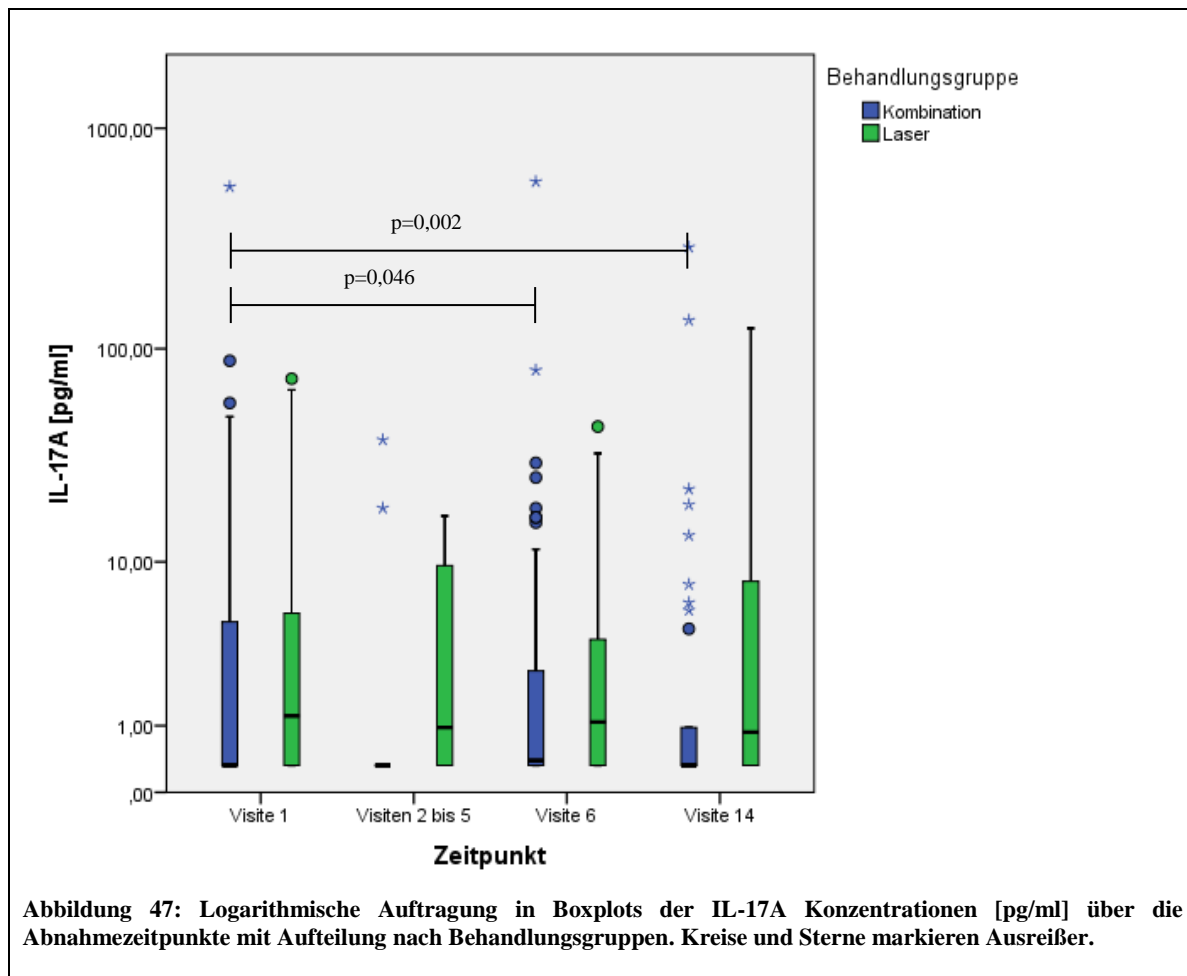
Tabelle 36: IL-17A Statistiken

IL-17A [pg/ml]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		14,29	5,39	13,71	11,79	7,99	5,58	5,41	12,41
<b>Median</b>		0,33	0,33	0,39	0,33	1,22	0,96	1,08	0,87
<b>Standard- abweichung</b>		63,45	12,12	73,19	47,52	16,72	7,36	10,30	29,11
<b>Varianz</b>		4026,49	146,78	5356,38	2258,03	279,57	54,15	106,08	847,58
<b>Minimum</b>		0,32	0,33	0,32	0,33	0,32	0,33	0,32	0,32
<b>Maximum</b>		543,64	38,13	573,59	289,59	72,86	16,72	43,90	123,87
<b>Perzentile</b>	25	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
	50	0,33	0,33	0,39	0,33	1,22	0,96	1,08	0,87
	75	5,01	0,33	2,69	0,96	5,51	13,15	4,56	10,87

**Tabelle 37: IL-17A Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte**

Wie bei IL-10 finden sich hohe Mittelwerte im Vergleich zu den niedrigen Medianen, was auf Ausreißer hindeutet. Betrachtet man die Perzentile, so sind mehr als die Hälfte bis Dreiviertel der Werte im sehr niedrigen Bereich.

Stellt man die Konzentrationen zu den verschiedenen Visiten aufgeteilt nach Behandlungsgruppen von IL-17A als Boxplots dar, erhält man Abbildung 47. Es gibt signifikante Unterschiede in der Kombinationsgruppe zwischen V1 und V6 ( $p=0,046$ ) bzw. V1 und V14 ( $p=0,002$ ), da niedrigere Konzentrationen von IL-17A and der Screeningvisite vorlagen.



### 3.2.4 MCP-1

Die Übersicht zu den MCP-1 Konzentrationen sind in Tabelle 38 und in Tabelle 39 gelistet.

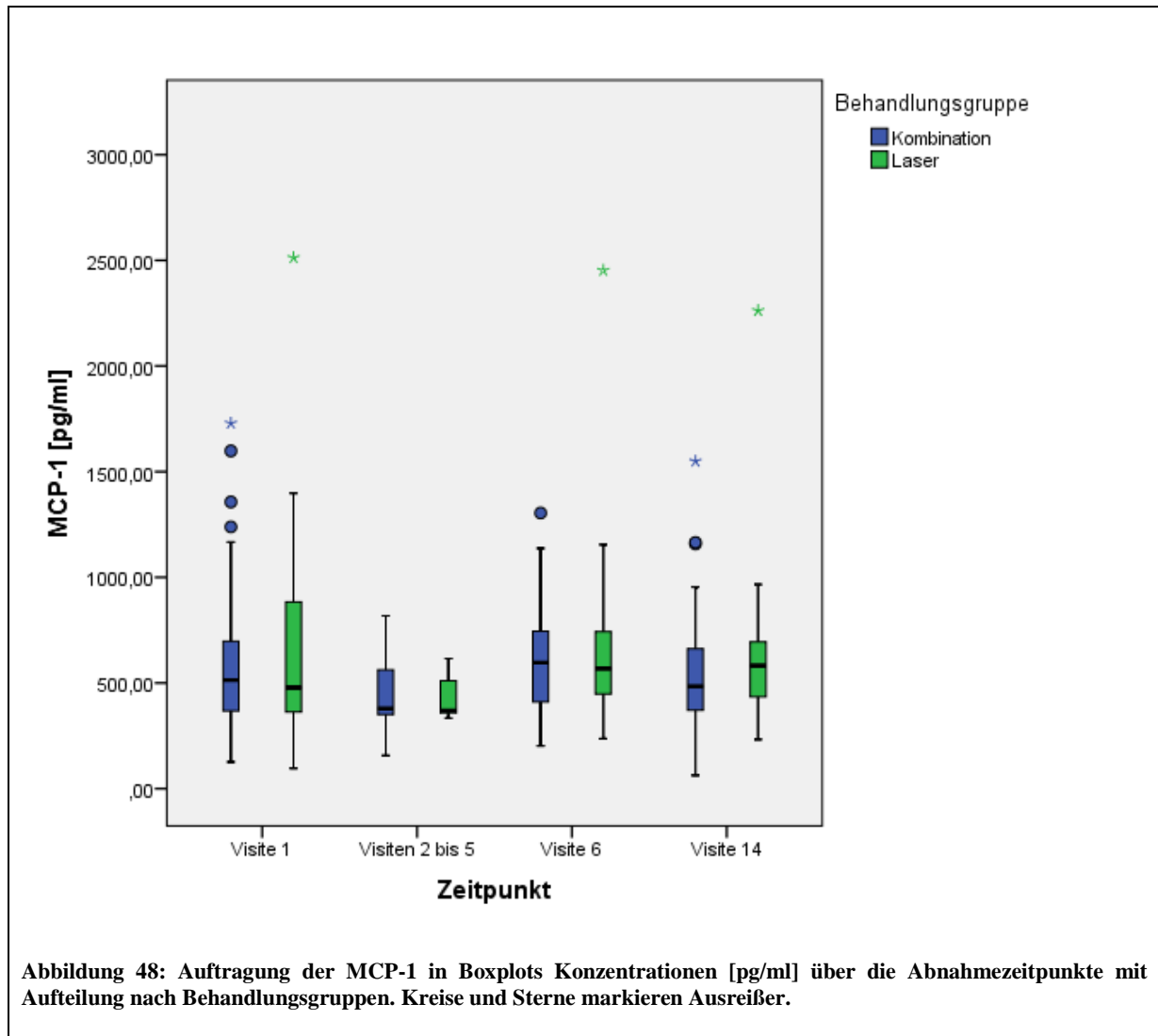
MCP-1 [pg/ml]	V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>	598,25	450,47	608,04	573,52
<b>Median</b>	505,09	374,80	582,61	505,23
<b>Standardabweichung</b>	366,47	167,84	301,86	329,77
<b>Varianz</b>	134298,10	28169,51	91119,91	108746,41
<b>Minimum</b>	95,77	156,55	201,85	62,49
<b>Maximum</b>	2512,59	817,23	2452,57	2262,39
<b>Perzentile</b>	25	364,83	343,68	425,63
	50	505,09	374,80	582,61
	75	734,43	574,97	744,27

Tabelle 38: MCP-1 Statistik

MCP-1 [pg/ml]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	573,04	456,23	595,35	542,57	648,66	437,77	634,28	627,98	
<b>Median</b>	513,83	379,36	595,93	483,79	478,56	370,25	568,13	582,49	
<b>Standard- abweichung</b>	307,70	190,47	237,88	294,81	462,95	121,03	407,24	384,12	
<b>Varianz</b>	94676,26	36277,97	56586,14	86912,47	214326,37	14647,80	165845,13	147550,85	
<b>Minimum</b>	126,37	156,55	201,85	62,49	95,77	333,82	236,72	232,65	
<b>Maximum</b>	1729,20	817,23	1304,28	1549,39	2512,59	615,65	2452,57	2262,39	
<b>Perzen- tile</b>	25	368,07	338,73	407,46	365,83	362,20	346,18	444,83	428,86
	50	513,83	379,36	595,93	483,79	478,56	370,25	568,13	582,49
	75	705,20	588,36	746,89	664,85	884,88	563,13	747,90	701,27

Tabelle 39: MCP-1 Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte





Die MCP-1 Konzentrationen verteilt auf Visiten und Behandlungsgruppen sind in Abbildung 48 zu sehen. Es liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Visiten innerhalb der Behandlungsgruppe vor. Bei der Zwischenvisite (V2-V5) gibt es in beiden Behandlungsarmen eine Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu den übrigen Visiten.

### 3.2.5 VEGF

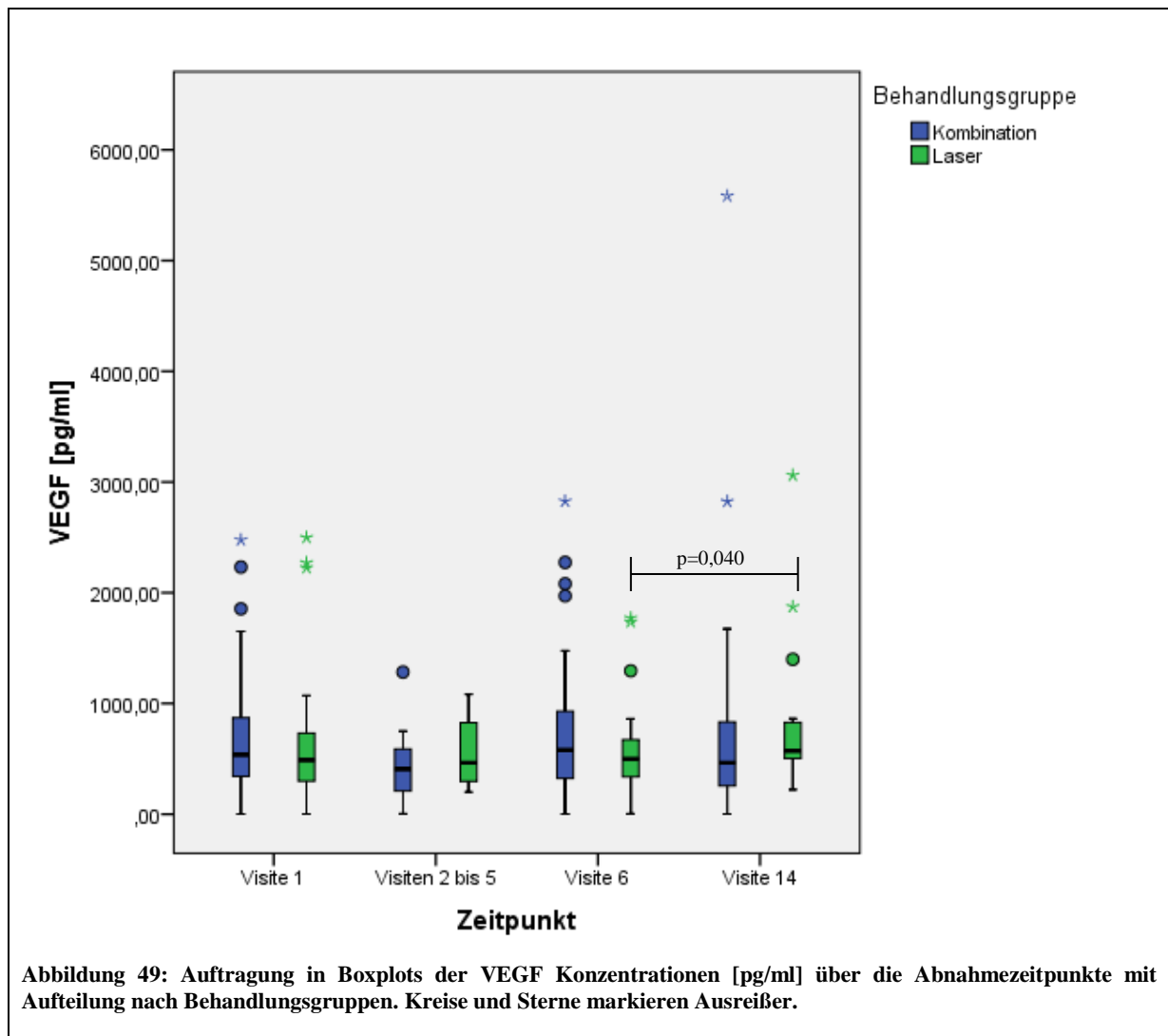
VEGF [pg/ml]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=68)
<b>Mittelwert</b>		639,75	482,87	639,91	735,98
<b>Median</b>		520,08	436,76	516,26	542,31
<b>Standardabweichung</b>		511,97	363,81	516,69	815,66
<b>Varianz</b>		262112,81	132358,26	266970,24	665309,27
<b>Minimum</b>		1,60	4,80	1,60	1,60
<b>Maximum</b>		2498,75	1283,79	2826,71	5582,79
<b>Perzentile</b>	25	321,22	209,18	332,84	339,48
	50	520,08	436,76	516,26	542,31
	75	843,22	715,01	776,14	830,88

Die aus den Messwerten berechneten VEGF-Werte sind in Tabelle 40 und Tabelle 41 gelistet.

Tabelle 40: VEGF Statistiken

VEGF [pg/ml]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=43)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	650,26	441,35	670,41	721,69	618,71	574,22	576,88	760,55	
<b>Median</b>	538,05	408,96	579,16	465,11	489,63	464,57	499,90	571,42	
<b>Standardabweichung</b>	476,48	370,63	562,32	928,43	582,76	371,15	408,08	589,80	
<b>Varianz</b>	227037,95	137367,00	316199,45	861975,70	339613,17	137752,51	166526,41	347869,77	
<b>Minimum</b>	1,60	4,80	1,60	1,60	1,60	199,75	4,80	221,42	
<b>Maximum</b>	2477,15	1283,79	2826,71	5582,79	2498,75	1082,88	1771,48	3061,12	
<b>Perzentile</b>	25	341,63	209,18	318,03	223,48	286,81	248,70	336,82	489,05
	50	538,05	408,96	579,16	465,11	489,63	464,57	499,90	571,42
	75	878,63	607,28	931,05	845,16	740,15	954,58	676,26	830,26

Tabelle 41: VEGF Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



Die VEGF-Messwerte aufgeteilt nach Behandlungsgruppen sind in Abbildung 49 zu sehen. Mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben zeigt sich, dass im Laserarm die VEGF-Konzentration an V14 im Vergleich zu V6 signifikant erhöht ist ( $p=0,040$ ). Vergleicht man die Mediane der Sammelvisite (V2-V5), so ist im Kombinationsarm die VEGF Konzentration numerisch, jedoch nicht signifikant verringert, an Visite 6 jedoch höher als an Visite 1. Ein Einfluss von Ranibizumab auf die VEGF-Konzentration ist theoretisch in der Initialphase denkbar, jedoch ist nach 4 aufeinanderfolgenden Injektionen an Visite 6 keine Reduktion der VEGF-Level zu erkennen.

Auch bei Patienten, die nach Abbruch der klinischen Prüfung der Zwischenvisite (V2-V5) zugeordnet wurden, ist kein Einfluss auf die VEGF-Konzentrationen feststellbar.

### 3.2.6 Apo-AI

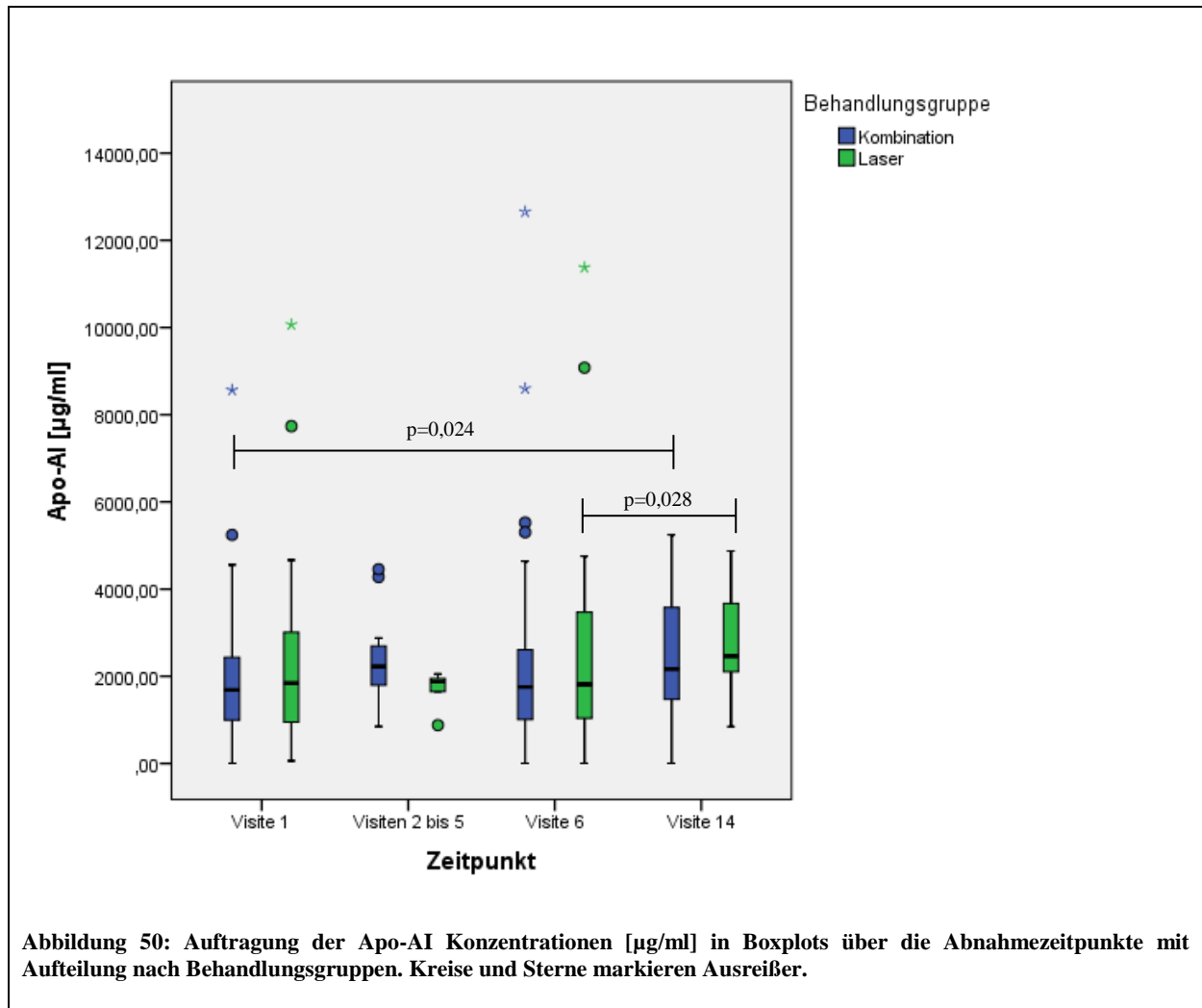
Die Berechnungen der Apo-AI-Konzentrationen kann man Tabelle 42 und Tabelle 43 entnehmen. Die zugehörigen Boxplots sind in Abbildung 50 dargestellt.

Apo-AI [ $\mu\text{g/ml}$ ]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		2014,99	2201,52	2330,26	2548,73
<b>Median</b>		1707,15	1994,20	1753,50	2430,20
<b>Standardabweichung</b>		1640,17	989,65	2177,47	1303,97
<b>Varianz</b>		2690150,97	979413,74	4741380,05	1700336,71
<b>Minimum</b>		6,40	848,10	6,40	6,40
<b>Maximum</b>		10067,50	4454,80	12652,90	5244,90
<b>Perzentile</b>	25	971,75	1683,75	1016,00	1543,35
	50	1707,15	1994,20	1753,50	2430,20
	75	2754,93	2466,65	2995,93	3665,55

Tabelle 42: Apo-AI Statistik

Apo-AI [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	1890,95	2437,29	2223,20	2411,44	2263,06	1682,82	2551,51	2790,37	
<b>Median</b>	1688,95	2224,10	1753,50	2166,90	1846,40	1878,60	1815,00	2463,90	
<b>Standardabweichung</b>	1418,65	1088,33	2018,26	1344,12	2010,36	471,68	2496,97	1218,74	
<b>Varianz</b>	2012561,4	1184454,8	4073372,2	1806655,2	4041544,7	222485,8	6234853,5	1485316,5	
<b>Minimum</b>	6,40	848,10	6,40	6,40	62,70	880,90	6,40	843,10	
<b>Maximum</b>	8565,90	4454,80	12652,90	5244,90	10067,50	2052,60	11376,70	4874,30	
<b>Perzentile</b>	25	986,38	1776,30	1008,68	1454,53	942,00	1266,90	973,63	1881,40
	50	1688,95	2224,10	1753,50	2166,90	1846,40	1878,60	1815,00	2463,90
	75	2477,20	2878,40	2656,00	3619,30	3052,35	2000,85	3479,60	3815,80

Tabelle 43: Apo-AI Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



Zwei signifikante Unterschiede in den Konzentrationen über die Zeit sind erkennbar. Im Vergleich zu Visite 1 ist im Kombinationsarm an Visite 14 die Apo-AI Konzentration signifikant erhöht. Im Laserarm liegt an Visite 14 eine signifikant höhere Konzentration als an Visite 6 vor.

### 3.2.7 Apo-AII

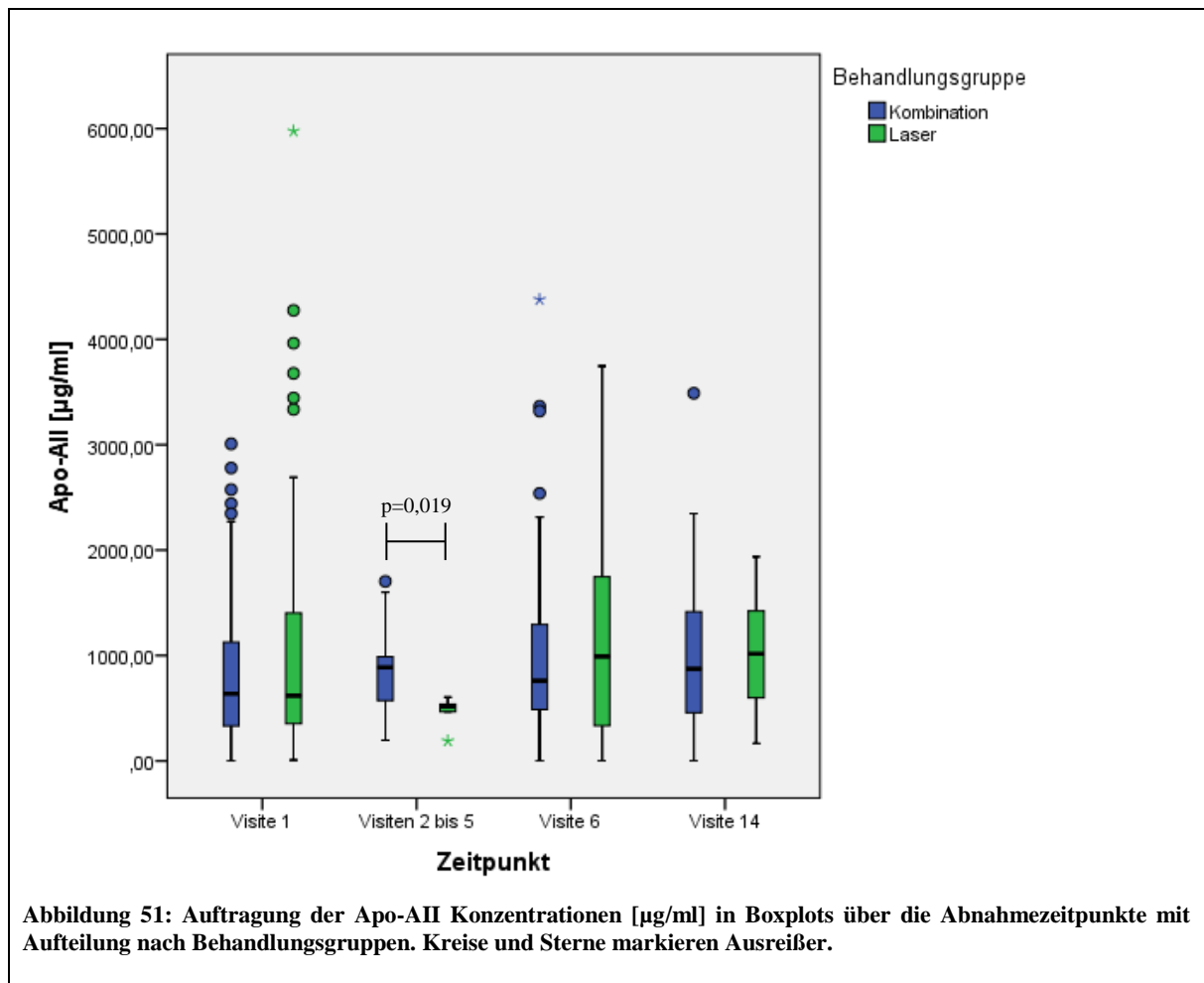
In Tabelle 44 zusammengefasst ist der Überblick der gemessenen Konzentrationen und Berechnungen von Apo-AII ohne Berücksichtigung der Behandlungsgruppe, wohingegen in Tabelle 45, die Behandlungsgruppe berücksichtigt ist.

Apo-AII [µg/ml]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		963,14	746,44	1075,85	962,53
<b>Median</b>		634,10	594,35	783,43	981,80
<b>Standardabweichung</b>		1012,10	427,41	902,42	631,27
<b>Varianz</b>		1024356,70	182679,12	814365,74	398505,84
<b>Minimum</b>		1,22	189,90	1,22	1,22
<b>Maximum</b>		5976,40	1703,40	4378,07	3488,60
<b>Perzentile</b>	25	334,73	524,40	425,10	468,10
	50	634,10	594,35	783,43	981,80
	75	1207,98	971,20	1453,60	1419,20

Tabelle 44: Apo-AII Statistik

Apo-AII [µg/ml]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	827,95	875,10	1024,51	933,36	1233,53	463,40	1181,95	1013,88	
<b>Median</b>	637,10	887,20	760,78	874,20	618,50	520,10	990,75	1017,10	
<b>Standardabweichung</b>	693,29	453,25	848,85	693,31	1428,82	160,58	1011,19	513,40	
<b>Varianz</b>	480646,34	205439,95	720551,93	480679,96	2041531,25	25785,42	1022498,45	263575,63	
<b>Minimum</b>	1,22	195,40	1,22	1,22	7,70	189,90	1,22	164,70	
<b>Maximum</b>	3007,90	1703,40	4378,07	3488,60	5976,40	603,60	3747,00	1935,80	
<b>Perzentile</b>	25	329,18	557,20	478,55	456,30	334,95	328,00	325,60	539,30
	50	637,10	887,20	760,78	874,20	618,50	520,10	990,75	1017,10
	75	1127,45	994,70	1308,29	1414,85	1431,95	570,45	1795,28	1465,75

Tabelle 45: Apo-AII Konzentrationen [µg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



Im Gegensatz zu Apo-AI, zeigt sich bei den Apo-AII Serumkonzentrationen kein Unterschied innerhalb der Behandlungsgruppen an den Abnahmezeitpunkten (Abbildung 51). Dafür handelt es sich bei Apo-AII um einen von zwei Biomarkern, bei denen es einen signifikanten Unterschied zwischen dem Kombinationsarm und dem Laserarm an einer Visite gibt. An der Sammelvisite (V2 bis V5), zu der alle Patienten zusammengefasst sind, die bei Studienabbruch noch in der Initialphase waren, ist die Konzentration von Apo-AII im Kombinationsarm signifikant höher als im Laserarm ( $p=0,019$ , getestet mit Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau). In der Lasergruppe ergibt sich eine Tendenz zu höheren Konzentrationen bei Visite 6 und Visite 14 im Gegensatz zur Visite 1.

### 3.2.8 Apo-B

Die Apo-B Konzentrationen an den Visiten mit und ohne Aufteilung nach Behandlungsgruppen mit den Berechnungen sind in Tabelle 46 und Tabelle 47 zusammengefasst.

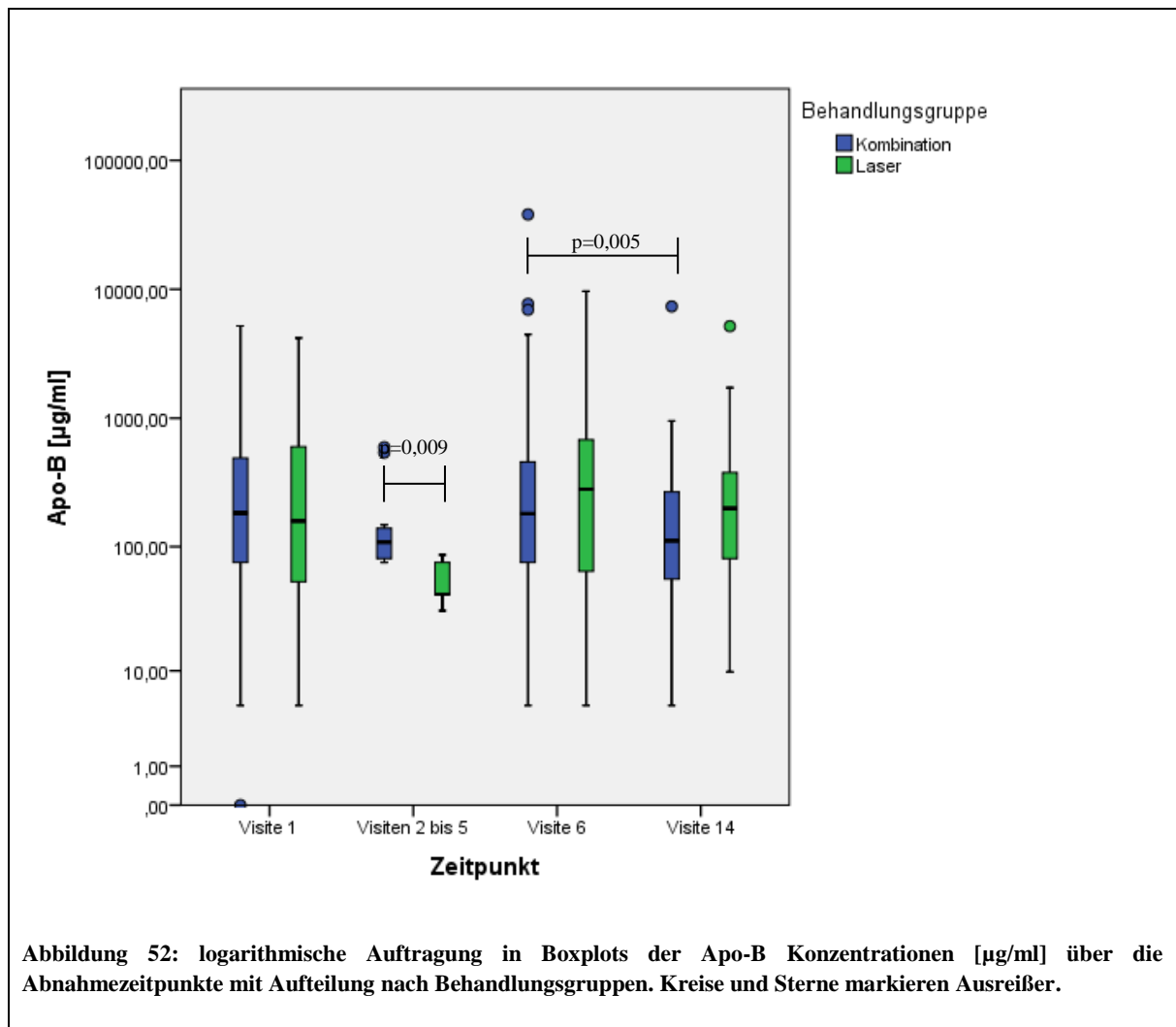
Apo-B [ $\mu\text{g/ml}$ ]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		513,71	144,01	1119,22	411,11
<b>Median</b>		177,70	83,50	198,70	142,40
<b>Standardabweichung</b>		872,96	168,20	4223,24	1078,19
<b>Varianz</b>		762054,98	28289,71	17835765,81	1162485,28
<b>Minimum</b>		4,92	31,20	4,92	4,92
<b>Maximum</b>		5204,60	593,40	38033,73	7357,90
<b>Perzentile</b>	25	75,10	75,10	64,10	64,10
	50	177,70	83,50	198,70	142,40
	75	546,90	125,48	518,93	302,30

Tabelle 46: Apo-B Statistik

Apo-B [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		499,86	184,38	1231,46	357,67	541,39	55,36	887,24	505,18
<b>Median</b>		183,35	108,60	180,85	111,40	159,40	42,10	280,65	199,10
<b>Standardabweichung</b>		873,49	191,01	4962,34	1103,00	882,93	23,89	2021,82	1048,56
<b>Varianz</b>		762992,86	36484,05	24624819,5	1216616,2	779569,03	570,58	4087761,43	1099483,42
<b>Minimum</b>		4,92	75,10	4,92	4,92	4,92	31,20	4,92	9,80
<b>Maximum</b>		5204,60	593,40	38033,73	7357,90	4189,90	86,30	9658,45	5167,70
<b>Perzentile</b>	25	75,10	80,70	73,73	54,38	50,28	36,65	61,33	75,55
	50	183,35	108,60	180,85	111,40	159,40	42,10	280,65	199,10
	75	495,63	148,00	458,05	273,55	662,73	80,70	691,90	391,95

Tabelle 47: Apo-B Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte





Die gemessenen Apo-B Konzentrationen sind in Abbildung 52 als Boxplots dargestellt. An Visite 14 ist die Apo-B Konzentration im Kombinationsarm signifikant niedriger als an Visite 6. Neben dem vorher beschriebenen Fall bei Apo-AII, gibt es auch bei Apo-B eine Visite bei der sich die Konzentration zwischen Laser- und Kombinationsarm signifikant unterscheidet. An der Sammelvisite (Visiten 2-5) ist die Konzentration von Apo-B im Kombinationsarm signifikant höher als im Laserarm ( $p=0,009$ , berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Niveau). Im Laserarm ergibt sich darüber hinaus noch eine Tendenz zur niedrigeren Apo-B Konzentration an der Zwischensvisite. Auch an Visite 6 liegt eine höhere Konzentration im Gegensatz zu den anderen Visiten vor, welche aber nicht signifikant ist.

### 3.2.9 Apo-CII

In Tabelle 48 sind die Berechnungen der Apo-CII Konzentrationen ohne Berücksichtigung der Therapie dargestellt, in Tabelle 49 mit.

Apo-CII [ $\mu\text{g/ml}$ ]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		375,23	320,04	461,61	557,18
<b>Median</b>		116,30	144,05	212,70	254,50
<b>Standardabweichung</b>		625,80	451,40	664,80	728,28
<b>Varianz</b>		391619,57	203763,24	441945,36	530387,13
<b>Minimum</b>		0,09	36,50	0,09	0,09
<b>Maximum</b>		3115,63	1466,20	3431,90	3047,70
<b>Perzentile</b>	25	53,28	81,60	80,70	81,30
	50	116,30	144,05	212,70	254,50
	75	345,95	313,55	468,05	740,50

Tabelle 48: Apo-CII Statistik

Apo-CII [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		327,07	412,53	426,59	484,37	471,55	116,58	533,97	685,31
<b>Median</b>		122,00	172,70	212,70	216,30	111,73	121,00	238,50	344,30
<b>Standardabweichung</b>		525,81	523,27	657,08	623,70	788,23	65,62	685,99	882,60
<b>Varianz</b>		276476,55	273814,97	431753,65	389004,15	621308,90	4306,54	470583,87	778976,84
<b>Minimum</b>		0,09	62,80	0,09	0,09	1,20	36,50	0,09	24,10
<b>Maximum</b>		3115,63	1466,20	3431,90	2890,00	3062,60	208,00	2580,70	3047,70
<b>Perzentile</b>	25	52,03	102,30	84,75	80,80	50,83	55,60	63,68	87,95
	50	122,00	172,70	212,70	216,30	111,73	121,00	238,50	344,30
	75	339,63	382,90	443,80	748,65	480,88	175,35	729,53	749,90

Tabelle 49: Apo-CII Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte

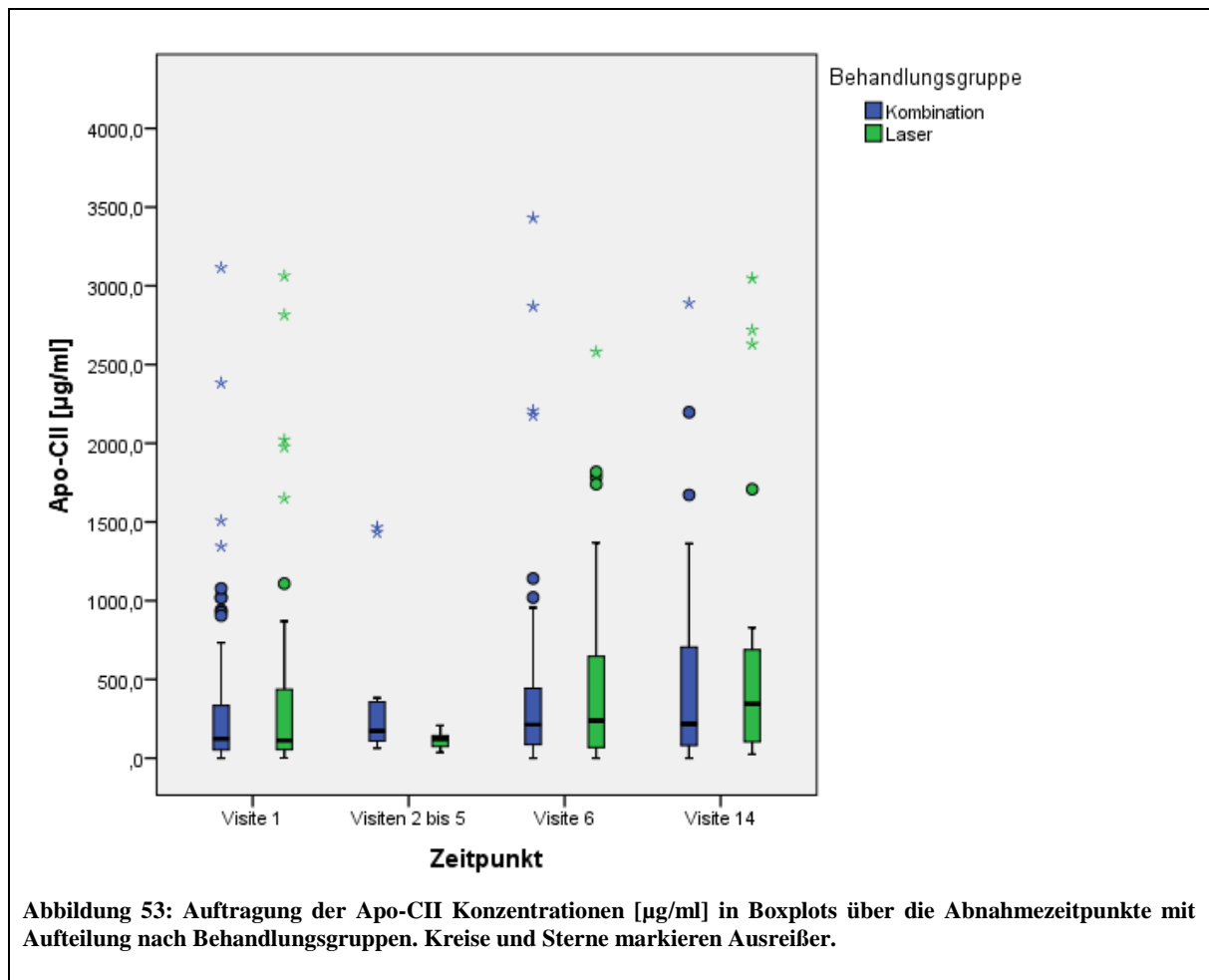


Abbildung 53: Auftragung der Apo-CII Konzentrationen [µg/ml] in Boxplots über die Abnahmezeitpunkte mit Aufteilung nach Behandlungsgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

In Abbildung 53 sind die Messergebnisse von Apo-CII über die Visiten verteilt aufgetragen. Zudem wird nach Behandlungsgruppen unterschieden. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Serum Apo-CII Konzentration zwischen den Visiten oder innerhalb der Behandlungsgruppen. In der Lasergruppe ist eine Tendenz zu höheren Apo-CII Konzentrationen bei Visite 14 im Vergleich zu den übrigen Visiten erkennbar.

### 3.2.10 Apo-CIII

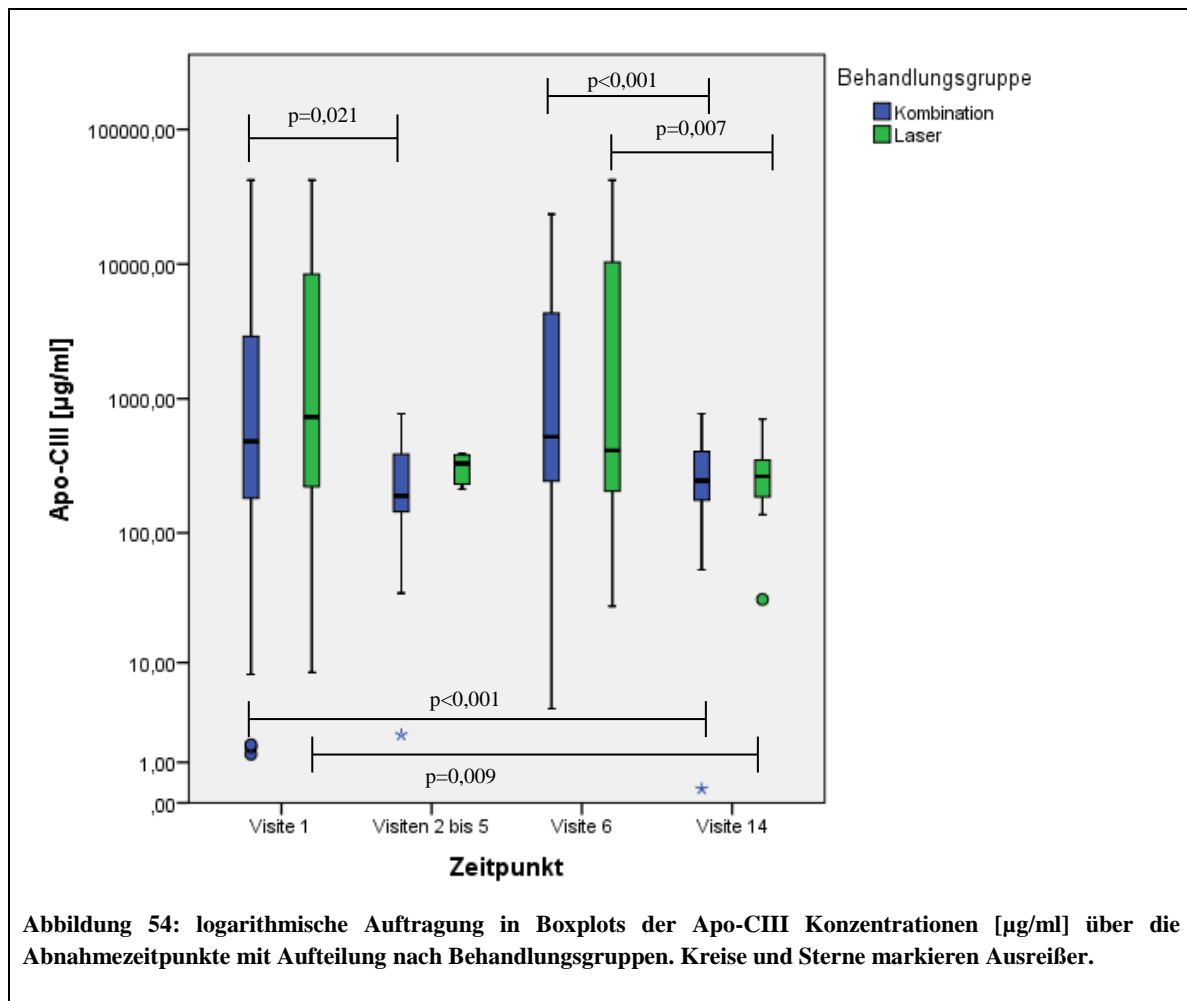
In Tabelle 50 und Tabelle 51 sind Mittelwerte, Median, Standardabweichung etc. der Apo-CIII Werte mit und ohne Berücksichtigung der Therapie dargestellt.

Apo-CIII [ $\mu\text{g/ml}$ ]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		5235,26	289,22	5919,94	304,67
<b>Median</b>		487,30	257,05	501,30	251,90
<b>Standardabweichung</b>		10631,63	195,05	11229,98	177,41
<b>Varianz</b>		113031515,50	38042,74	126112462,65	31472,86
<b>Minimum</b>		1,30	2,20	4,00	0,27
<b>Maximum</b>		42000,00	774,30	42000,00	774,00
<b>Perzentile</b>	25	199,58	178,43	239,44	182,70
	50	487,30	257,05	501,30	251,90
	75	4563,35	387,93	5702,28	393,30

Tabelle 50 Apo-CIII Statistik

Apo-CIII [ $\mu\text{g/ml}$ ]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		3477,31	280,09	4109,77	301,2107	8751,16	309,30	9660,95	310,77
<b>Median</b>		482,30	189,60	522,65	246,15	789,10	330,20	416,50	265,00
<b>Standardabweichung</b>		7062,46	232,45	6717,12	178,5391	15001,87	82,74	16713,53	178,89
<b>Varianz</b>		49878314,0	54032,63	45119720,7	31876,2	225056223,82	6845,52	279342045,14	32000,87
<b>Minimum</b>		1,30	2,20	4,00	0,27	8,30	213,10	27,80	31,40
<b>Maximum</b>		42000,00	774,30	23444,40	774	42000,00	390,20	42000,00	705,70
<b>Perzentile</b>	25	177,63	116,90	244,24	172,575	217,40	222,50	199,40	183,90
	50	482,30	189,60	522,65	246,15	789,10	330,20	416,50	265,00
	75	2965,08	474,50	4513,00	411,7	8400,00	385,65	10853,90	358,70

Tabelle 51: Apo-CIII Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



Im Gegensatz zu den vorangegangenen Biomarkern konnten für Apo-CIII einige signifikante Unterschiede zwischen den Visiten festgestellt werden (Abbildung 54). In der Kombinationsgruppe ist die Konzentration bei der Sammelvisite und an Visite 14 signifikant niedriger als an Visite 1. Darüber hinaus zeigt sich in der Kombigruppe an Visite 6 eine signifikant höhere Konzentration als an Visite 14. In der Lasergruppe liegt jeweils an Visite 1 und Visite 6 eine signifikant höhere Konzentration verglichen mit Visite 14 vor.

### 3.2.11 Apo-E

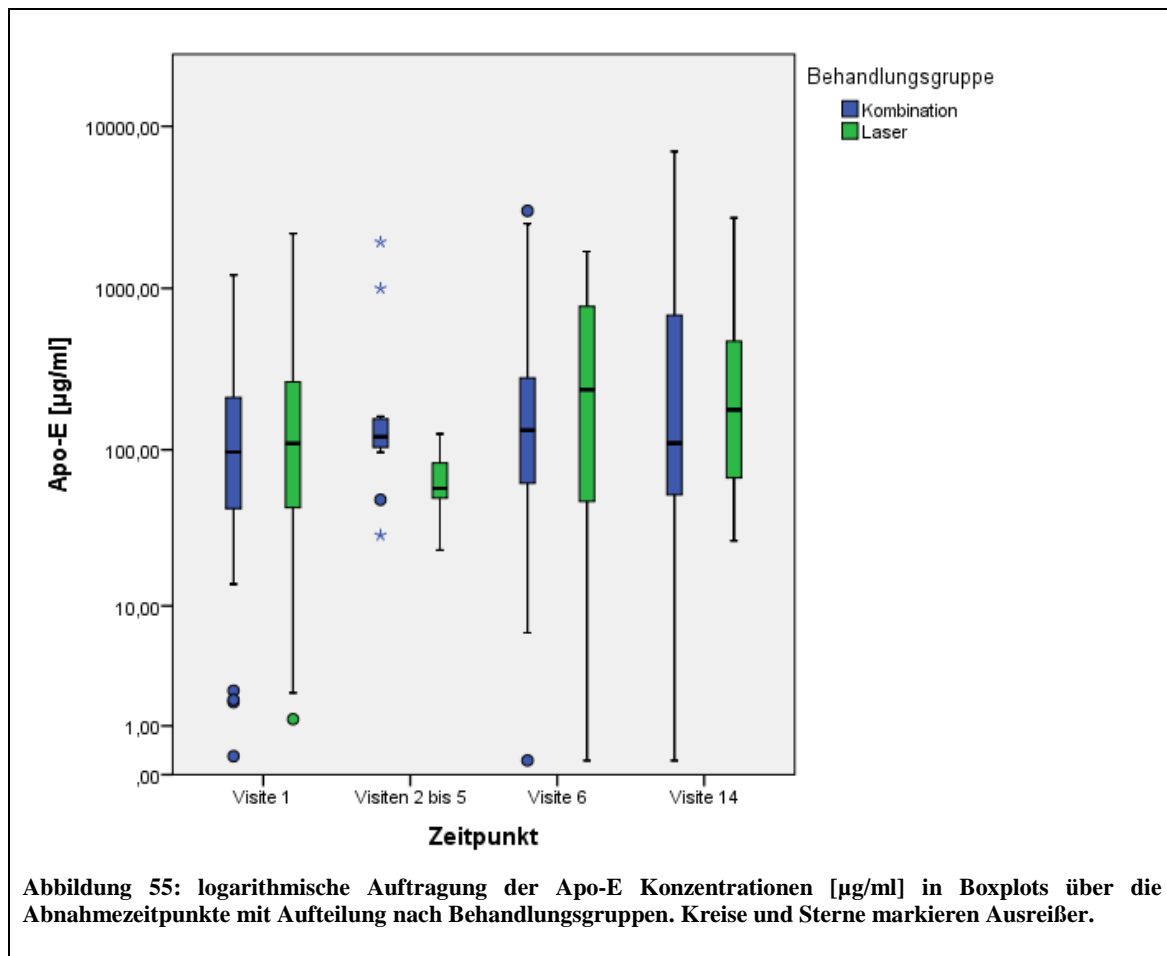
Für einen Überblick der Apo-E Messergebnisse sind in Tabelle 52 die Konzentrationsberechnungen nach Visiten aufgeteilt gelistet. In Tabelle 53 sind die Ergebnisse zusätzlich noch nach Behandlungsgruppen aufgeteilt.

Apo-E [ $\mu\text{g/ml}$ ]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		225,48	264,62	373,16	481,75
<b>Median</b>		100,10	115,55	154,55	147,70
<b>Standardabweichung</b>		346,69	500,01	558,013	950,32
<b>Varianz</b>		120191,83	250009,47	311377,99	903100,58
<b>Minimum</b>		0,30	23,30	0,22	0,22
<b>Maximum</b>		2176,20	1930,20	3008,30	7000,00
<b>Perzentile</b>	25	42,88	51,68	58,08	62,60
	50	100,10	115,55	154,55	147,70
	75	242,78	145,00	414,58	684,45

Tabelle 52: Apo-E Statistik

Apo-E [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Kombination				Laser				
	V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)	
<b>Mittelwert</b>	194,83	354,12	345,53	479,54	286,78	67,72	430,27	485,65	
<b>Median</b>	96,90	120,60	132,65	109,95	109,55	57,30	236,70	177,10	
<b>Standardabweichung</b>	272,91	588,41	590,44	1075,59	458,60	38,65	488,64	697,12	
<b>Varianz</b>	74478,73	346221,04	348620,53	1156904,2	210312,27	1493,59	238771,02	485973,41	
<b>Minimum</b>	0,30	29,00	0,22	0,22	1,20	23,30	0,22	26,70	
<b>Maximum</b>	1207,30	1930,20	3008,30	7000,00	2176,20	125,60	1687,90	2725,00	
<b>Perzentile</b>	25	42,63	96,40	61,35	52,10	42,00	36,55	47,60	64,83
	50	96,90	120,60	132,65	109,95	109,55	57,30	236,70	177,10
	75	214,88	161,50	279,74	714,98	293,00	104,10	788,53	627,35

Tabelle 53: Apo-E Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



In Abbildung 55 sind die Apo-E Messwerte als Boxplots dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen zwischen den Behandlungsgruppen an den verschiedenen Visiten. Auch zwischen den Visiten lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Numerisch liegt bei Apo-E im Laserarm eine niedrigere Konzentration bei der Sammelvisite (Visiten 2-5) im Gegensatz zu den anderen Visiten vor, die aber nicht signifikant ist.

### 3.2.12 sVCAM-1

Die Übersicht zu den MCP-1 Konzentrationen sind Tabelle 54 und Tabelle 55 zusammengefasst.

sVCAM-1 [ng/ml]	V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)	
Mittelwert	1741,68	1435,69	1194,45	1702,52	
Median	1567,54	1484,04	1156,23	1674,01	
Standardabweichung	1180,59	490,70	651,61	636,62	
Varianz	1393790,26	240785,88	424599,38	405290,02	
Minimum	21,91	367,03	38,33	3,05	
Maximum	6163,40	2467,01	3847,21	3349,57	
Perzentile	25	988,02	1125,34	761,27	1242,28
	50	1567,54	1484,04	1156,22	1674,01
	75	2118,61	1630,02	1523,91	2027,51

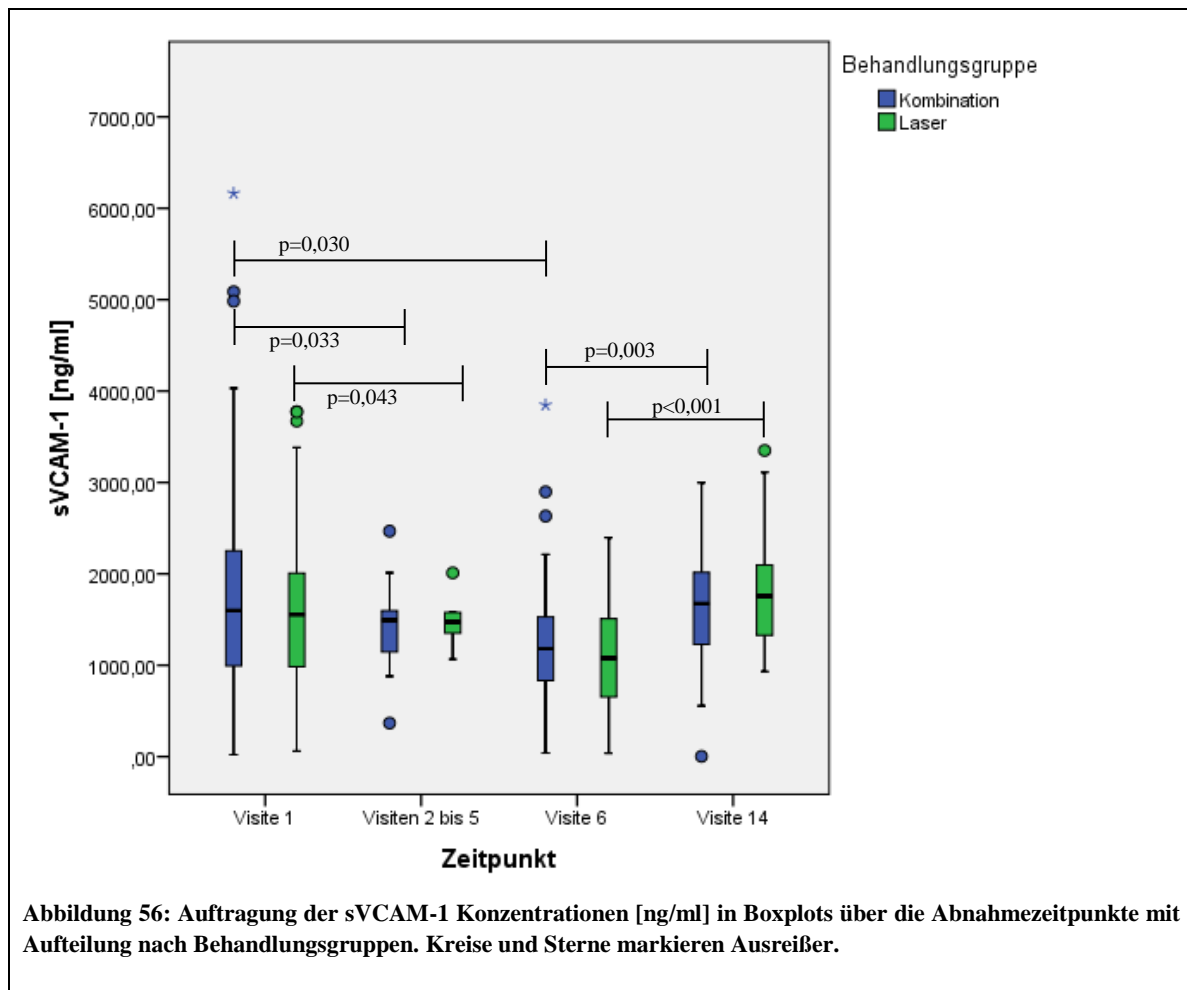
Tabelle 54: sVCAM-1 Statistik

sVCAM-1 [ng/ml]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		1814,27	1408,35	1264,33	1650,12	1596,50	1495,86	1050,03	1794,75
<b>Median</b>		1598,59	1494,02	1181,28	1673,43	1553,90	1474,06	1077,59	1757,16
<b>Standard- abweichung</b>		1247,73	557,45	679,73	652,02	1033,68	345,67	573,14	610,51
<b>Varianz</b>		1556834,46	310750,55	462033,77	425134,94	1068493,63	119489,51	328485,04	372725,98
<b>Minimum</b>		21,91	367,03	40,26	3,05	61,47	1065,00	38,33	930,69
<b>Maximum</b>		6163,40	2467,01	3847,21	2996,78	3775,39	2009,97	2397,03	3349,57
<b>Per- zen- tile</b>	25	990,48	1103,57	824,01	1223,61	932,99	1208,45	597,40	1298,21
	50	1598,59	1494,02	1181,28	1673,43	1553,90	1474,06	1077,59	1757,16
	75	2306,45	1647,24	1536,96	2017,22	2032,31	1794,17	1511,45	2162,16

**Tabelle 55: sVCAM-1 Konzentrationen [ng/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte**

Bei der Auftragung der Ergebnisse der Serum-Konzentrationsmessungen des Adhäsionsmoleküls sVCAM-1 zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Visiten (Abbildung 56).





Die Mediane der Sammelvisite und der Visite 6 im Kombinationsarm sind signifikant niedriger als der Median an Visite 1. In der Lasergruppe ist der Median an der Sammelvisite (V2 bis V5) ebenso signifikant niedriger als an Visite 1. Bei beiden Behandlungsgruppen wurden ebenfalls signifikant höhere Konzentrationen gemessen als an Visite 6. Die Visite 6 Konzentration im Laserarm ist numerisch niedriger als die an Visite 1, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

### 3.2.13 ICAM-1

Die Berechnungen der sICAM-1 Serumkonzentrationen sind in Tabelle 56 dargestellt. Die Verteilung auf die Kombi- und Lasergruppe kann in Tabelle 57 betrachtet werden.

sICAM-1 [ng/ml]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=16)	V6 (n=92)	V14 (n=69)
<b>Mittelwert</b>		173,38	137,57	130,09	170,09
<b>Median</b>		146,40	124,69	121,46	157,49
<b>Standardabweichung</b>		134,27	64,36	87,30	86,86
<b>Varianz</b>		18029,63	18029,63	4142,02	7620,86
<b>Minimum</b>		4,15	34,90	6,62	1,20
<b>Maximum</b>		876,18	307,94	714,75	621,66
<b>Perzentile</b>	25	92,58	104,57	82,37	121,71
	50	146,40	124,69	121,46	157,49
	75	210,41	146,92	155,96	189,08

Tabelle 56: sICAM-1 Statistik

sICAM-1 [ng/ml]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
<b>Mittelwert</b>		184,75	114,23	141,27	164,16	150,62	188,92	106,98	180,52
<b>Median</b>		149,86	122,01	130,32	151,67	136,86	153,61	112,19	165,83
<b>Standardabweichung</b>		148,25	29,96	98,83	92,38	98,56	92,17	50,49	76,86
<b>Varianz</b>		21979,11	897,85	9767,44	8533,90	9713,95	8494,89	2548,79	5907,02
<b>Minimum</b>		4,15	34,90	6,62	1,20	9,91	92,99	7,14	90,18
<b>Maximum</b>		876,18	149,74	714,75	621,66	435,36	307,94	243,93	393,53
<b>Perzentile</b>	25	95,65	102,76	82,73	109,62	90,74	109,93	72,02	127,62
	50	149,86	122,01	130,32	151,67	136,86	153,61	112,19	165,83
	75	246,67	127,70	170,51	183,27	180,65	285,56	140,38	211,56

Tabelle 57: sICAM-1 Konzentrationen [ng/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte

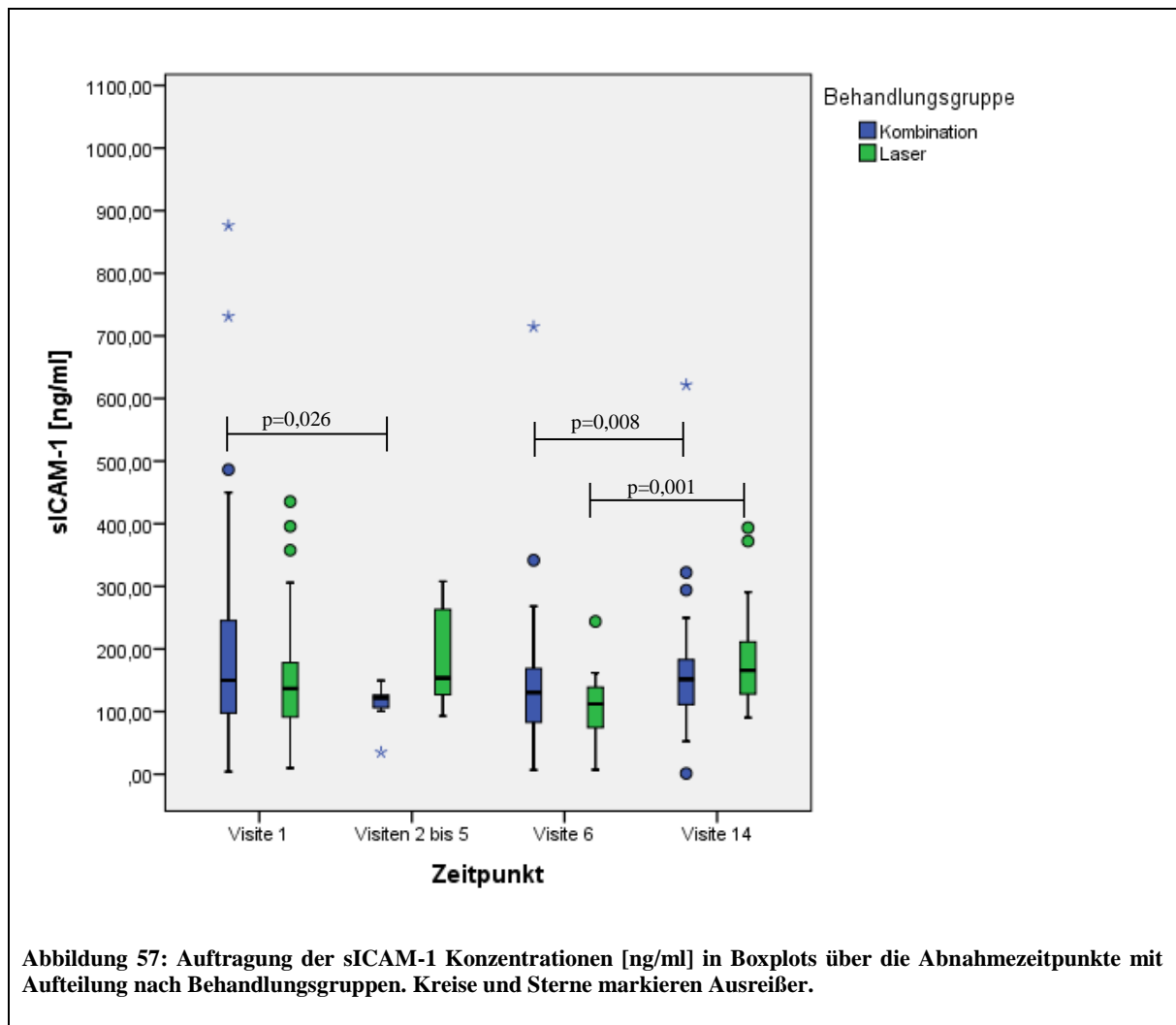


Abbildung 57: Auftragung der sICAM-1 Konzentrationen [ng/ml] in Boxplots über die Abnahmezeitpunkte mit Aufteilung nach Behandlungsgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Die entsprechenden Boxplots sind in Abbildung 57 aufgetragen. Im Kombinationsarm sind die Konzentrationen an der Zwischenvisite signifikant niedriger als an Visite 1. In beiden Therapiearmen liegt der Median an Visite 14 der Serumkonzentrationen signifikant über der Konzentration an Visite 6. Darüber hinaus gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Visiten oder Behandlungsgruppen. Bei Visite 6 im Laserarm ist eine Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu den übrigen Visiten erkennbar.

### 3.2.14 IL-6

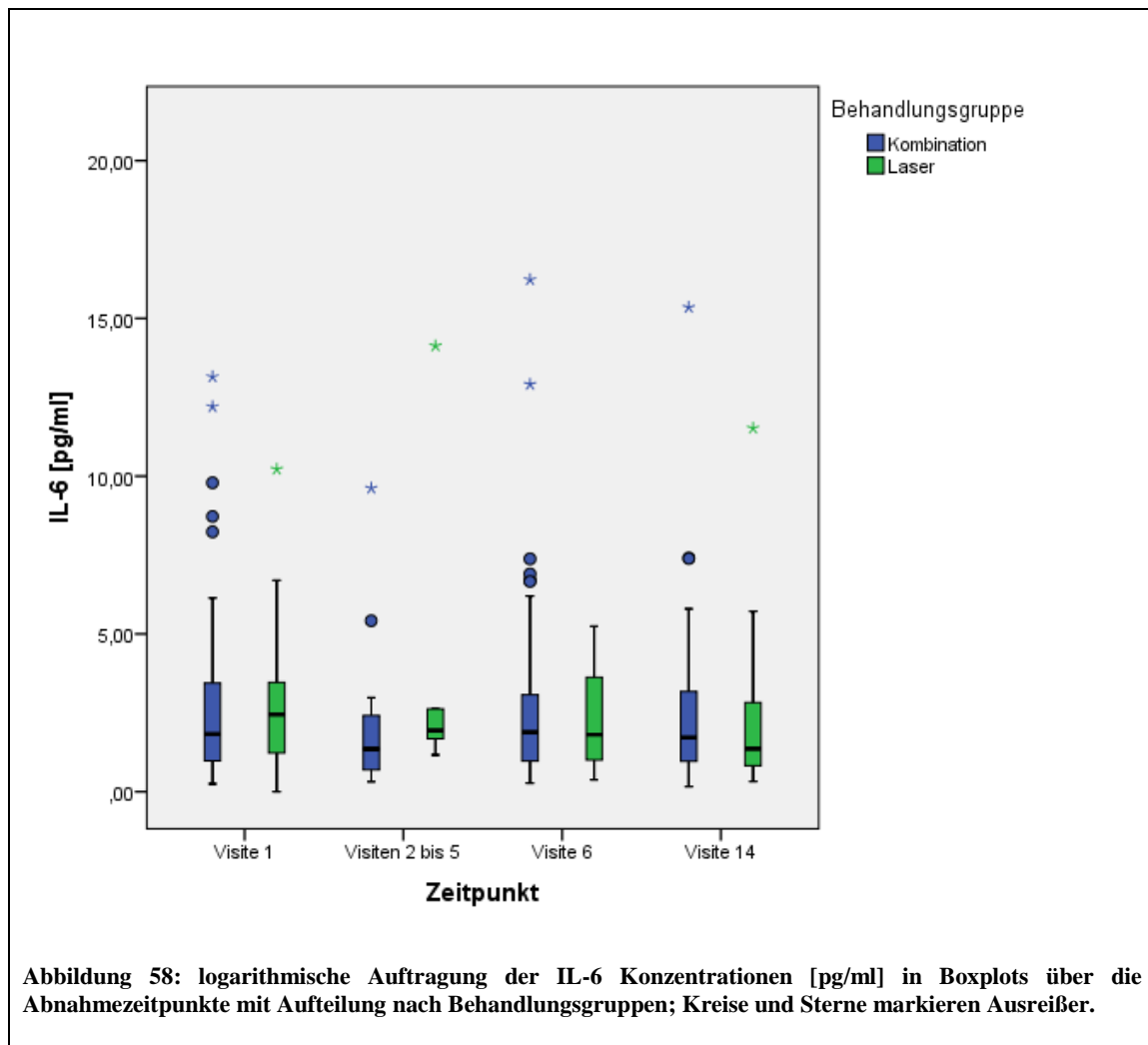
IL-6 [pg/ml]		V1 (n=114)	V2-V5 (n=14)	V6 (n=92)	V14 (n=71)
Mittelwert		2,67	2,32	2,56	2,63
Median		1,92	1,53	1,89	1,62
Standardabweichung		2,37	2,47	2,50	2,88
Varianz		5,62	6,11	6,26	8,29
Minimum		0,00	0,32	0,27	0,16
Maximum		13,15	9,62	16,23	15,35
Perzentile	25	1,071	0,70	0,98	0,94
	50	1,92	1,53	1,89	1,62
	75	3,48	2,71	3,44	3,04

Die deskriptiven Daten von IL-6 sind anbei aufgelistet, sowohl aufgeteilt nach Visiten als auch nach Behandlungsgruppen (Tabelle 58 und Tabelle 59).

Tabelle 58: IL-6 Statistik

IL-6 [pg/ml]		Kombination				Laser			
		V1 (n=76)	V2-V5 (n=11)	V6 (n=62)	V14 (n=44)	V1 (n=38)	V2-V5 (n=5)	V6 (n=30)	V14 (n=25)
Mittelwert		2,61	2,38	2,72	2,61	2,67	4,31	2,25	2,28
Median		1,82	1,36	1,89	1,72	2,45	1,94	1,80	1,36
Standardabweichung		2,55	2,81	2,87	2,67	2,01	5,52	1,48	2,38
Varianz		6,48	7,87	8,22	7,15	4,03	30,43	2,20	5,65
Minimum		0,25	0,32	0,27	0,16	0,002	1,17	0,37	0,32
Maximum		13,15	9,62	16,23	15,35	10,22	14,13	5,24	11,52
Perzentile	25	0,97	0,69	0,96	0,96	1,20	1,42	0,94	0,81
	50	1,82	1,36	1,89	1,72	2,45	1,94	1,80	1,36
	75	3,48	2,98	3,08	3,25	3,48	8,38	3,67	2,86

Tabelle 59: IL-6 Konzentrationen [pg/ml] aufgetragen nach Behandlungsgruppen und Abnahmezeitpunkte



Die Ergebnisse der IL-6 Messungen sind in Abbildung 58 dargestellt. Es gibt keine signifikanten Unterschiede bei den Medianen zwischen den Visiten innerhalb einer Behandlungsgruppe und auch nicht zwischen den Behandlungsgruppen an einer Visite. Tendenziell höher ist im Laserarm die Konzentration an Visite 1 verglichen mit den anderen Visiten.

### 3.2.15 Überblick: Änderungen der Biomarkerkonzentrationen im Vergleich zu Baseline

In Tabelle 60 folgt ein Überblick zur Entwicklung der Biomarkerkonzentrationen unter Therapie. Es sind sowohl signifikante Änderungen (fettgedruckte, rote Pfeile) dargestellt als auch auffällige Tendenzen (dünne Pfeile), die nicht signifikant sind.

Biomarker	Kombination			Laser		
	V2-5	V6	V14	V2-5	V6	V14
IL-8	↓					↓
IL-10						↓
IL-17A		↓	↓			
MCP-1	↓			↓		
VEGF	↓	↑				
Apo-AI			↑			
Apo-AII					↑	↑
Apo-B				↓	↑	
Apo-CII						↑
Apo-CIII	↓		↓			↓
Apo-E				↓		
sVCAM-1	↓	↓	↑	↓	↓	
sICAM-1	↓				↓	
IL-6				↓	↓	↓

**Tabelle 60: Überblick über die signifikanten Änderungen im Vergleich zu Visite 1 (fettgedruckte, rote Pfeile) und tendenzielle Veränderungen Konzentrationen im Vergleich zu Visite 1 (schwarze Pfeile)**

Signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur Visite 1 lagen vor:

- Im Kombiarm:
  - an V2-V5: IL-8, Apo-CIII, sVCAM-1, sICAM-1
  - an V6: sVCAM-1, IL-17A
  - an V14: Apo-CIII, IL-17A
- Im Laserarm:
  - an V2-V5: sVCAM-1
  - an V14: IL-8, Apo-CIII, IL-10

Signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zur Visite 1 lagen nur im Kombinationsarm an Visite 14 bei Apo-AI vor.

Beim Vergleich der Behandlungsgruppen ergaben sich an Visite 1 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten in der Kombinations- und in der Lasergruppe. Das gilt auch für die Visiten 6 und 14. Lediglich bei der Sammelvisite *Visite 2-5* gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der Kombinations- und der Lasergruppe bei den Biomarkern Apo-AII ( $p=0,019$ ) und Apo-B ( $p=0,009$ ) (berechnet mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Niveau).

### 3.2.16 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen, Baselinecharakteristika und Ansprechen auf die Therapie

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen gewissen Baselinecharakteristika und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 gibt, wurden Stichprobentests durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

#### 3.2.16.1 Biomarkerkonzentrationen der Patienten mit PDR

Bei 20,2 % der Patienten lag zum Zeitpunkt des Studienstarts eine PDR vor (Abbildung 31 in Kapitel 3.1.1). Um zu testen ob sich die Anwesenheit einer PDR in den Serumkonzentrationen der Patienten an Visite 1 widerspiegelt, wurden mittels Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben die Werte der PDR Patienten mit den Werten der NPDR Patienten verglichen. Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane sind mit den entsprechenden p-Werten in Tabelle 61 dargestellt. Die Biomarkerkonzentrationen bei Visite 1 unterschieden sich zwischen NPDR und PDR Patienten nicht signifikant.

	NPDR (n=89)			PDR (n=23)			p-Wert*
	Mittelwert	± SD	Median	Mittelwert	± SD	Median	
<b>IL-8</b>	18,82	± 41,11	12,73	13,11	± 11,75	8,47	0,317
<b>IL-10</b>	4,84	± 6,48	1,18	3,88	± 5,06	0,96	0,427
<b>IL-17A</b>	13,07	± 58,90	0,71	9,74	± 18,55	0,33	0,838
<b>MCP-1</b>	609,24	± 375,86	512,47	530,85	± 323,76	484,09	0,266
<b>VEGF</b>	593,24	± 483,25	473,44	726,79	± 484,67	585,65	0,106
<b>Apo-AI</b>	1992,96	± 1741,05	1695,40	1961,38	± 1101,99	1675,00	0,612
<b>Apo-All</b>	970,00	± 1088,86	618,80	897,22	± 645,71	663,10	0,416
<b>Apo-B</b>	514,99	± 890,69	187,70	349,64	± 627,09	133,10	0,687
<b>Apo-CII</b>	372,17	± 615,73	120,50	279,36	± 375,31	96,30	0,837
<b>Apo-CIII</b>	5858,78	± 11736,27	483,50	3181,85	± 4693,05	584,30	0,322
<b>Apo-E</b>	247,31	± 383,48	101,50	128,02	± 98,88	81,80	0,911
<b>sVCAM-1</b>	1753,61	± 1227,61	1561,91	1696,03	± 1054,44	1662,37	0,989
<b>sICAM-1</b>	174,43	± 141,00	143,97	173,37	± 113,45	154,29	0,730
<b>IL-6</b>	2,41	± 1,98	1,91	3,11	± 3,17	1,93	0,679

Tabelle 61: Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 aufgeteilt nach nicht Vorhandensein/Vorhandensein einer PDR; \*Signifikanztest berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben auf dem 5 % Signifikanzniveau; NPDR: nicht-proliferative diabetische Retinopathie, PDR: proliferative diabetische Retinopathie

Dies kann einerseits an den sehr großen Standardabweichungen der Proben liegen, andererseits auch an den sehr ähnlichen Medianen. Jedoch ist die IL-8, MCP-1, Apo B, Apo CII und CIII Konzentration bei NPDR Patienten tendenziell höher als bei PDR Patienten. Die VEGF Konzentration zeigt eine Tendenz zu höheren Werten bei PDR-Patienten.

Des Weiteren wurde getestet, ob es eine Korrelation zwischen Konzentration der Biomarker an Visite 1 und dem Ansprechen unter Therapie gibt (Visus, CRT, Injektionshäufigkeit). Dafür wurden die Gruppen NPDR und PDR und die beiden Behandlungsgruppen aufgeteilt um den Therapieeffekt möglichst auszuschließen und die Gruppen einzeln zu betrachten (Spearman-Rho Korrelationstest; 95 % Signifikanzniveau). Alle Korrelationen sind in Tabelle 92 (Seite 225) im Anhang zusammengefasst. In der NPDR Gruppe traten einige signifikante Werte auf, die jedoch im niedrigen

Bereich lagen (Korrelationskoeffizient unter 0,5), so dass man nicht von einer Korrelation ausgehen kann. Mit Vorsicht muss man die PDR Gruppe betrachten, vor allem die Lasergruppe, da diese nur 5 Patienten umfasst. Daher ist in der Lasergruppe der Patienten mit PDR (n=5) keine Aussage möglich. In der etwas größeren PDR Gruppe im Kombinationsarm trat eine signifikante Korrelation auf (IL-17 Wert korreliert mit der Anzahl der Injektionen bezogen auf die Visitenzahl), deren Korrelationskoeffizient größer als 0,5 war, wenn auch noch im Bereich unter 0,7. Dieser Wert könnte womöglich einen Hinweis auf eine vorhandene Korrelation geben. Da die Fallzahl aber klein ist (18 Patienten), sind unbedingt weitere Untersuchungen nötig um einen tatsächlichen Zusammenhang zu bestätigen.

Eine Aussage über einen prädiktiven Biomarker für das Outcome ist also mit den Ergebnissen dieser Studie nicht möglich.

### **3.2.16.2 Verteilung der Retinopathiestadien und Biomarkerkonzentrationen**

Bei den 114 Patienten mit Biomarkerbestimmung, verteilten sich die Retinopathiestadien wie in Abbildung 30 (Kapitel 3.1.1.) dargestellt. 72,81 % sind dem Stadium NPDR (n=83) zuzuordnen, 23 Patienten dem Stadium PDR. Davon haben 12 Patienten (10,53 %) eine milde und 11 (9,65 %) eine moderate Form der PDR. Es gibt keine signifikanten Unterschiede bei den Biomarkerkonzentrationen im Serum im Vergleich zu den verschiedenen Retinopathiestadien (Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben). Auch mit dieser Untersuchung zeigen sich numerisch höhere Werte von VEGF in den Stadien milde und moderate PDR im Vergleich zu NPDR. IL-17A ist numerisch bei den NPDR Stadien höher konzentriert, als in den PDR Stadien, was die Tendenz der IL-17A Konzentration im Kapitel 3.2.16.1 bekräftigt. Ebenso verhält es sich bei den IL-8, Apo-CII und CIII Konzentrationen, die in Kapitel 3.2.16.1 bei NPDR Patienten tendenziell höher lagen, als bei PDR Patienten. Bei den Konzentrationen von MCP-1 und Apo-B kann die Tendenz aus Kapitel 3.2.16.1 jedoch mit der hier verwendeten Einteilung der Retinopathiestadien nicht bestätigt werden.

Diese Tendenzen müssen in weiteren Studien bekräftigt werden. Anhand dieser Ergebnisse gibt es keinen Zusammenhang zwischen Serum-Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 und dem Retinopathiestadium.



DR-Stadium	Fragliche DR (n=1)	NPDR (n=83)			Milde PDR (n=12)			Moderate PDR (n=11)			p-Wert*
		Mittelwert	± SD	Median	Mittelwert	± SD	Median	Mittelwert	± SD	Median	
<b>Biomarkerkonzentration Visite 1</b>											
<b>IL-8</b>	9,52	18,67 ± 42,32	12,73	13,21 ± 14,57	8,05	13,00 ± 8,38	10,10	0,705			
<b>IL-10</b>	2,75	5,11 ± 6,62	1,28	2,74 ± 3,10	0,96	5,12 ± 6,52	0,96	0,760			
<b>IL-17A</b>	8,42	13,48 ± 60,91	0,73	11,96 ± 23,39	0,33	7,33 ± 11,95	0,47	0,735			
<b>MCP-1</b>	641,96	595,84 ± 371,27	497,72	579,67 ± 327,03	533,54	477,59 ± 327,07	375,57	0,366			
<b>VEGF</b>	369,99	566,59 ± 421,58	475,26	677,46 ± 383,78	701,14	780,61 ± 590,49	511,76	0,362			
<b>Apo-AI</b>	2066,00	1995,87 ± 1794,82	1695,40	1878,68 ± 1150,76	1641,40	2051,59 ± 1094,46	1675,00	0,894			
<b>Apo-AII</b>	637,30	990,10 ± 1120,28	618,80	680,86 ± 355,14	638,85	1133,24 ± 813,07	894,70	0,683			
<b>Apo-B</b>	176,40	533,09 ± 916,76	187,70	184,71 ± 171,55	119,80	529,57 ± 874,36	170,70	0,739			
<b>Apo-CII</b>	100,80	382,58 ± 631,70	121,90	233,07 ± 409,34	94,10	329,87 ± 346,69	148,70	0,867			
<b>Apo-CIII</b>	249,60	6128,06 ± 12088,22	415,90	1695,47 ± 2472,25	532,70	4803,36 ± 6015,62	1026,00	0,681			
<b>Apo-E</b>	116,00	253,28 ± 102,00	392,78	92,18 ± 71,74	78,60	167,12 ± 112,36	184,30	0,689			
<b>sVCAM-1</b>	1872,58	1760,18 ± 1269,98	1561,91	1770,12 ± 895,45	1683,37	1615,19 ± 1245,10	1253,09	0,843			
<b>sICAM-1</b>	201,56	175,42 ± 145,26	143,97	191,72 ± 122,83	159,04	153,36 ± 104,29	129,75	0,652			
<b>IL-6</b>	5,02	2,34 ± 1,97	1,86	3,21 ± 3,08	2,25	2,99 ± 3,42	1,53	0,486			

Tabelle 62: Mittelwert mit Standardabweichung und Median der Serumkonzentration bei Visite 1 der verschiedenen Biomarker aufgeteilt nach Retinopathiestadien (ETDRS Einteilung); SD: Standardabweichung. \*Signifikanztest berechnet mit dem Kruskal-Wallis Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau. DR: diabetische Retinopathie, NPDR: nicht-proliferative diabetische Retinopathie, PDR: proliferative diabetische Retinopathie

### **3.2.16.3 Verteilung der DMÖ-Typen und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1**

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob man anhand der Biomarkerkonzentration erkennen kann welcher DMÖ-Typ vorliegt. Diese Verteilung ist in Abbildung 32, Kapitel 3.1.1 dargestellt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen der Biomarker an Visite 1 zwischen den DMÖ-Typen (Kruskal-Wallis Test unabhängiger Stichproben, siehe Tabelle 63). Tendenzen lassen sich aber feststellen. So ist z.B. die IL-17 und Apo-AIII Konzentration (Mittelwert und Median) im fokalen Stadium niedriger als bei Patienten mit intermediärem oder diffusem DMÖ. Bei MCP-1 verhält es sich umgekehrt (Tabelle 63).

DMÖ Typ	Fokal (n=17)			Intermediär (n=46)			Diffus (n=48)			p-Wert*
	Mittelwert	± SD	Median	Mittelwert	± SD	Median	Mittelwert	± SD	Median	
<b>Biomarkerkonzentration Visite 1</b>										
<b>IL-8</b>	14,52	± 12,72	12,15	14,16	± 10,93	11,41	22,35	± 55,05	13,10	0,873
<b>IL-10</b>	4,64	± 6,30	1,17	4,04	± 4,83	0,96	5,25	± 7,36	1,24	0,766
<b>IL-17A</b>	5,34	± 9,66	0,33	8,79	± 20,18	0,33	18,40	± 78,56	0,96	0,186
<b>MCP-1</b>	686,78	± 584,38	598,74	598,04	± 302,20	523,41	574,82	± 334,72	478,99	0,705
<b>VEGF</b>	510,50	± 359,74	537,77	595,25	± 407,56	511,73	696,78	± 583,58	495,90	0,745
<b>Apo-AI</b>	1707,61	± 1222,02	1678,10	2118,12	± 1518,19	1705,30	1976,43	± 1895,40	1767,50	0,604
<b>Apo-AII</b>	689,56	± 564,84	482,40	991,08	± 961,01	625,05	1039,81	± 1193,28	648,20	0,714
<b>Apo-B</b>	358,16	± 658,81	136,70	490,63	± 820,60	183,35	568,98	± 990,87	216,05	0,534
<b>Apo-CII</b>	370,30	± 757,37	98,60	368,39	± 566,72	128,95	371,14	± 638,99	114,00	0,870
<b>Apo-CIII</b>	2209,01	± 4660,24	366,60	5653,01	± 12042,13	520,70	6128,34	± 10962,31	434,75	0,638
<b>Apo-E</b>	173,97	± 273,30	88,20	228,29	± 303,68	102,60	248,89	± 415,50	94,20	0,639
<b>sVCAM-1</b>	1877,17	± 1403,88	1330,02	1733,45	± 1104,63	1576,35	1654,00	± 1195,43	1507,88	0,756
<b>sICAM-1</b>	206,99	± 197,76	146,57	170,84	± 106,83	153,84	162,07	± 135,27	130,37	0,451
<b>IL-6</b>	2,51	± 1,59	2,46	2,87	± 2,92	1,97	2,26	± 1,71	1,79	0,741

Tabelle 63: Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Median der Biomarkerkonzentrationen aufgeteilt nach den 3 Hauptstadien des Leckagetyps (fokal, intermediär, diffus). \*Signifikanztest berechnet mit dem Kruskal-Wallis Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau.

### **3.2.16.4 Verteilung der Ischämiegrade und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1**

In Tabelle 93 im Anhang sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Mediane der verschiedenen Biomarkermessungen zusammengefasst. Zwischen der Makulaischämie (Abbildung 33, Kapitel 3.1.1) und den Biomarkerkonzentrationen gibt es bei einem Biomarker einen Unterschied zwischen den Konzentrationen an Visite 1 und den Ischämiestadien (Kruskal-Wallis Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau). Mit einem p-Wert von 0,032 unterscheidet sich die MCP-1 Konzentration bei Visite 1 zwischen den Ischämiestadien. Diese Signifikanz muss aber durch weitere Untersuchungen bestätigt werden, denn von 36 Patienten lagen keine auswertbaren Bilder bei Baseline vor um den Ischämiegrad eindeutig zu bestimmen. Somit fällt ein großer Patientenanteil für den Vergleich weg und es kann nur eine bedingte Aussage über den Unterschied der Biomarker bei Baseline und dem jeweiligen Ischämiestadien getroffen werden.

### **3.2.17 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und weiteren Baselinewerten (Visus, zentrale Retinadicke)**

Um zu testen ob die Biomarkerwerte bei Baseline einen Hinweis auf den momentanen Status der Makulopathie am Auge geben, wurden verschiedene Korrelationen getestet. Die Rationale dafür ist, bei einer Blutabnahme beim Hausarzt einen Hinweis auf das Krankheitsgeschehen am Auge zu bekommen, da diese dem Patienten lange nicht auffallen. Gezielte Überweisungen zum Augenarzt wären so möglich.

Spearman-Rho Korrelationstests auf dem 95 % Signifikanzniveau wurden für die Biomarkerwerte bei Visite 1 mit den folgenden Parametern durchgeführt:

- Bestkorrigierter Visus (Visite 1 und Visite 2)
- Zentrale Retinadicke, die vom Zentrum gemessen wurde (Visite 1 und Visite 2)
- Foveal Center Point
- Central Subfield Mean
- HbA1c
- Alter
- Zeit seit Diagnosestellung des DMÖs in Monaten.

Es ergaben sich keine nennenswerten Korrelationen (Tabelle 94, Anhang Seite 228). Somit kann keiner der Biomarker als prognostischer Marker für momentanen Visus oder Retinadicke genutzt werden. Weiterhin wurde untersucht ob sich die Faktoren Geschlecht und Diabetes-Typ auf die Biomarkerkonzentrationen bei Baseline auswirkten (Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau). Dabei ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 95 und Tabelle 96 im Anhang).

### **3.2.18 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen und Begleittherapien**

Bei den Diabetikern in der RELATION Studie wurden 155 Begleittherapien gelistet, die entweder schon vor Beginn der klinischen Prüfung gestartet waren oder während der Studie mehr als eine Woche am Stück verabreicht wurden (siehe Tabelle 97 im Anhang, Seite 233). Um die Hypothese zu testen, ob eine Begleitmedikation mit der Biomarkerkonzentration korreliert, wurden die Baseline-Biomarkerkonzentrationen mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau untersucht. Für eine übersichtlichere Auswertung wurden Gruppen der

wichtigsten Begleittherapien gebildet und einige häufig verordnete Medikamente (mindestens 10 Patienten) zusätzlich betrachtet:

- Applikation wenigstens eines Insulins oder Insulin-Analogons
- Einnahme eines
  - oder mehrerer Antidiabetika
  - Sulfonylharnstoffes
  - von mindestens einem Lipidsenker
  - Statins
  - Medikaments, dass in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eingreift
  - ACE-Hemmer
  - Betablockers
  - Sartans
  - Ca-Kanalhemmers
  - Diuretikums
  - NO-Freisetzers
- Einnahme von
  - Medikamenten zur Blutgerinnung
  - Medikamenten zur Schmerztherapie
  - Schilddrüsenmedikamenten
  - Antidepressiva

Folgende Medikamente wurden auf Grund ihrer häufigen Verordnung einzeln betrachtet:

- |                            |                   |
|----------------------------|-------------------|
| • Metformin                | • Metoprolol      |
| • Humaninsulin             | • Enalapril       |
| • ASS                      | • Glimepirid      |
| • Simvastatin              | • Sitagliptin     |
| • Ramipril                 | • Timolol AT      |
| • Hydrochlorothiazid (HCT) | • Torasemid       |
| • Insulin glargin          | • Insulinaspartat |
| • Bisoprolol               | • Allopurinol     |
| • Amlodipin                |                   |

Die Häufigkeit der Gabe und die entsprechenden p-Werte sind in Tabelle 98 und Tabelle 99 ab Seite 233 im Anhang gelistet. Am Ende der Tabelle sind außerdem die Medikamente gelistet aus denen sich die oben genannten Medikamentengruppen zusammensetzen.

Es zeigen sich wenige signifikante Veränderungen in Abhängigkeit von der Medikamentengruppe. Die zugehörigen Mediane und Mittelwerte sind in Tabelle 100 und Tabelle 101 gelistet (Anhang, ab Seite 237).

Bei den RAAS-Medikamenten ist der Apo-B Wert signifikant niedriger bei Patienten mit Medikation im Vergleich zu nicht therapierten Patienten ( $p=0,043$ ). Unter Sartan Therapie ist sowohl die Apo-B-Konzentration signifikant reduziert ( $p=0,037$ ) als auch die Apo-AI Konzentration ( $p=0,0389$ ).

Bei NO-freisetzenden Medikamenten zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei Apo-CIII ( $p=0,047$ ) und Apo-E ( $p=0,043$ ). Die Konzentration beider Apolipoproteine ist reduziert, wenn NO-freisetzende Medikamente gegeben werden.

Die IL-17 Serumkonzentration ist signifikant niedriger bei Behandlung mit ACE-Hemmern ( $p=0,034$ ), speziell Ramipril sowie Diuretika ( $p=0,006$ ). Bei Einnahme von Hydrochlorothiazid ist die VEGF-Konzentration signifikant reduziert.

Auch bei Gabe von Schilddrüsenmedikamenten sind Apolipoprotein-Konzentrationen verringert und zwar Apo-AI, Apo-AII und Apo-B ( $p=0,026$ ;  $p=0,011$ ;  $p=0,019$ ).

In der Gruppe der Patienten, die mindestens ein Insulin applizierte, gibt es keine signifikanten Konzentrationsänderungen der Biomarker. Bei Gabe von Humaninsulin sind die IL-8 und IL-10 Konzentrationen signifikant verringert im Vergleich zu Patienten, die kein Humaninsulin anwenden. Auch bei Metoprolol Einnahme sind die IL-8 und IL-10 Konzentrationen reduziert. Hingegen sind bei Bisoprolol-Gabe die Apo-AI Konzentrationen verringert.

Patienten, die Allopurinol einnehmen weisen eine signifikant höhere IL-6 Konzentration auf, als Patienten, die dieses Medikament nicht zu sich nehmen.

Weitere Begleitmedikationen wurden bis zu einer Häufigkeit von 8,8 % (10 Patienten) untersucht. Dabei wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit oder ohne Begleittherapie festgestellt.

### **3.2.19 Einfluss der Biomarkerkonzentrationen bei Baseline auf das Outcome**

Eine weitere interessante Fragestellung ist, ob die Konzentration der Biomarker bei Visite 1 einen Einfluss auf das Ergebnis (Visus, CRT) hat. Man könnte sich z.B. vorstellen, dass ein grundsätzlich erhöhtes systemisches Entzündungsgeschehen das Ansprechen auf die Therapie vermindert.

Um einzuschätzen, ob der Ausgangswert der Biomarker Einfluss auf das Outcome hat, wurden mehrere bivariate Korrelationsanalysen gerechnet. Da die Biomarkerwerte nicht normalverteilt sind, wird der Spearman-Rho Korrelationstest herangezogen. Für den Ausgangswert der Biomarker wird die Konzentration an Visite 1 verwendet. Korreliert wurde mit folgenden Endpunkten:

- Visusänderung zwischen Baseline und den Visiten 6 und 14
- Quotient aus Injektionszahl und Visitenzahl
- Änderung der vom Zentrum gemessenen Retinadicke zwischen Baseline und Visite 6 und 14
- Änderung der vom Reading Center bestimmten mittleren zentralen Subfield Dicke zwischen Baseline und den Visiten 6 und 14
- Änderung des vom Reading Center bestimmten Foveal Center Points zwischen Baseline und den Visiten 6 und 14

Die Korrelationen sind in Tabelle 102 und Tabelle 103 im Anhang (ab Seite 238) zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden auf die Behandlungsgruppen aufgeteilt dargestellt und berechnet.

Bei den Berechnungen ergibt sich kein Korrelationskoeffizienten der über  $\pm 0,5$  liegt (Tabelle 102 und Tabelle 103). Wenige Signifikanzen (IL-17, MCP-1, sVCAM-1, IL-6 im Kombiarm, IL-8 und IL-17 im Laserarm) sind erkennbar, aber die Korrelationskoeffizienten sind zu niedrig, als dass man von einer Korrelation sprechen könnte.

Zusammengefasst zeigt sich keine Korrelation der Biomarkerwerte an Visite 1 mit dem Outcome.

### **3.2.20 Zusammenfassung: Biomarkerkonzentrationen, Baselinecharakteristika und Outcome**

Fasst man die letzten Kapitel zusammen, ergeben sich keine Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen bei Visite 1 bezogen auf die DR-Stadien, egal ob man lediglich in PDR und NPDR unterteilt oder die Werte mit Hilfe der feineren Unterteilung durch das Reading Center betrachtet. Auch die Baselinekonzentrationen bei den DMÖ-Stadien und Ischämie-Graden waren nicht signifikant verschieden. Darüber hinaus zeigten sich keine Korrelationen mit weiteren Baseline-Charakteristika wie z.B. Visus, Retinadicke oder HbA1c. Die untersuchten Biomarker eignen sich also nicht, über das momentane Krankheitsgeschehen im Auge Aufschluss zu geben.

Bei einigen Begleittherapien konnten Unterschiede zwischen den Biomarkerkonzentrationen festgestellt werden, je nachdem ob eine bestimmte Therapie durchgeführt wurde oder nicht. Vor allem die Apolipoprotein-Konzentrationen waren verschoben, aber auch die Zytokin-Konzentrationen. Ohne Begleitmedikation unterschieden sich die Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle.

Bei den weiteren Tests zum Effekt der Biomarkerkonzentrationen bei V1 auf Ansprechen des Visus und der CRT ergaben sich keine Korrelationen.

Trotz fehlender signifikanter Unterschiede oder Korrelationen konnten einige Tendenzen festgestellt werden (z.B. höhere VEGF-Konzentration bei Patienten mit PDR- verglichen mit NPDR-Patienten). Diese Tendenzen gilt es in weiteren Untersuchungen zu testen.

### 3.3 Vergleich der Biomarkerkonzentrationen verschiedener Probanden- und Patientengruppen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden nicht nur die Biomarkerkonzentrationen bei den DMÖ Patienten aus der RELATION Studie gemessen und ausgewertet, sondern auch bei folgenden Gruppen:

- einer Gruppe von 32 Probanden ohne jegliche Erkrankung (Normalkollektiv)
- 30 Diabetiker mit einer sehr frühen Diagnose bzw. einem Prädiabetes (Insulinresistenz)
- 42 Patienten mit Diabetes deren Proben in der Nephrologie abgenommen wurden
- 40 chronische Urtikaria Patienten
- 50 Multiple Sklerose Patienten

Die Demographischen Daten der verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 64 zusammengefasst.

		Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMÖ Patienten) (n=291)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patient n (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)
<b>Alter (Mittelwert)</b>		63,6	68,2	63,9	61,4	43,5	32,9
<b>Geschlecht (%)</b>	Männlich	40,6	56,7	62,3	64,3	60,0	38,0
	Weiblich	59,4	43,3	37,7	35,7	40,0	62,0
<b>Diabetestyp (%)</b>	Typ 1	0	0	11,4	9,5	0	0
	Typ 2	0	100	85,1	73,8	5	2
	unbekannt	0	0	3,5	16,7	0	0
<b>HbA1c (%)</b>		k. A.	6,1200	7,4693	k. A.	k. A.	k. A.

Tabelle 64: Demographie der Vergleichspopulationen

Wo möglich wurde angestrebt ein vergleichbares Alter der Kollektive zu erreichen. Zwischen den RELATION-Patienten und den Nephropathiepatienten gab es keinen signifikanten Altersunterschied. Das Kollektiv der frühen bzw. Prädiabetiker ist signifikant älter (einfaktorieller Anova-Test auf dem 95 % Signifikanzniveau), da es sich ausschließlich um Typ 2 Diabetiker handelt, bei der die jüngere Gruppe der Typ 1 Diabetiker fehlt. Die Typ 2 Diabetiker der RELATION Studie waren durchschnittlich 65,11 Jahre alt, die Typ 1 Diabetiker 54,15 Jahre. Bei den Patienten mit unbekanntem Diabetestyp in der RELATION lag der Durchschnitt bei 64,75 Jahren.

Die Urtikaria und die MS-Patienten sind signifikant jünger (33 und 44 Jahre), da diese Krankheitsbilder eher in jungen Jahren diagnostiziert werden (einfaktorieller Anova-Test auf dem 95 % Signifikanzniveau).

Auch die Geschlechterverteilung entspricht in den Vergleichsgruppen in etwa der der RELATION Studie (57-64 % Prozent Männer und 35-43 % Frauen in den Diabetes-Gruppen und der Urtikaria Gruppe). Lediglich bei den Multiple Sklerose Patienten und im Normalkollektiv lagen signifikant mehr Proben von Frauen als von Männern vor (60-62 % vs. 38-41 %). Bei den MS Patienten liegt das am häufigeren Auftreten der Krankheit bei Frauen ( $p=0,003$ , zweiseitiger exakter Test nach Fisher; für den Vergleich wurden die Diabetes-Gruppen und die Urtikaria-Gruppe zusammengefasst, das Normalkollektiv wurde nicht berücksichtigt).



Bei der Probenauswahl des Normalkollektivs wurde dem vergleichbarem Alter der Vorrang gegeben vor der Geschlechterverteilung ( $p=0,034$  zweiseitiger exakter Test nach Fisher; für den Vergleich wurden die Diabetes-Gruppen und die Urtikaria-Gruppe zusammengefasst, die MS-Gruppe nicht berücksichtigt).

Bei der RELATION Population und den Diabetikern mit Nephropathie lag eine Verteilung von 10 % Typ 1 und 90 % Typ 2 Diabetikern vor. Bei den frühen Diabetikern handelt es sich ausschließlich um Typ 2 Diabetiker. Zwei Urtikaria Patienten und ein Patient mit Multipler Sklerose hatten zusätzlich einen Typ 2 Diabetes.

Die Gruppe der Diabetiker mit Nephropathie enthält auch einige Patienten, die noch keine Beeinträchtigung der Niere hatten, aber im Nierenzentrum untersucht wurden ( $n=19$  ohne Nierenbeteiligung,  $n=23$  mit Nierenbeteiligung). Es handelt sich also um eine Mischgruppe von Diabetikern mit und ohne nephrotischen Veränderungen. Mit dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben zeigten sich aber keine Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne Nierenproblematik. Daher wird die Gruppe in allen Untersuchungen als Kollektiv betrachtet.

Für alle nachfolgenden Untersuchungen und Vergleiche der Biomarkerkonzentrationen wurden aus der RELATION-Population zwei Untergruppen gebildet. In einer Untergruppe wurden lediglich die Proben von Visite 1 berücksichtigt, damit mögliche Therapieeffekte ausgenommen werden (RELATION DMÖ Patienten Visite 1,  $n=114$ , s. Kapitel 3.2.15). Da aber nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Konzentrationsschwankungen der Biomarker nicht nur zufällig auftraten, wurde zusätzlich eine Untergruppe mit allen Probenzeitpunkten der RELATION Patienten gebildet (DMÖ Patienten,  $n=291$ ).

### 3.3.1 IL-8

Die IL-8 Konzentrationen der verschiedenen Gruppen sind in Tabelle 65 dargestellt.

IL-8 [pg/ml]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMÖ Patienten) (n=291)	Relation (DMÖ Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)
<b>Mittelwert</b>	6,25	34,53	16,33	17,5616	73,73	15,27	27,02
<b>Median</b>	5,38	32,62	10,68	12,1450	20,60	12,90	12,64
<b>Standardabweichung</b>	3,40	11,50	32,89	36,72620	299,95	11,11	30,83
<b>Varianz</b>	11,59	132,22	1081,53	1348,814	89969,17	123,53	950,44
<b>Minimum</b>	1,95	17,27	0,96	0,96	4,71	4,33	3,15
<b>Maximum</b>	16,42	64,44	388,86	388,86	1965,67	57,35	125,20
<b>Perzentile</b>	25	3,36	25,63	5,56	6,0425	14,63	7,47
	50	5,38	32,62	10,68	12,1450	20,60	12,90
	75	8,83	38,16	18,29	20,6575	32,75	21,15

Tabelle 65: IL-8 Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen

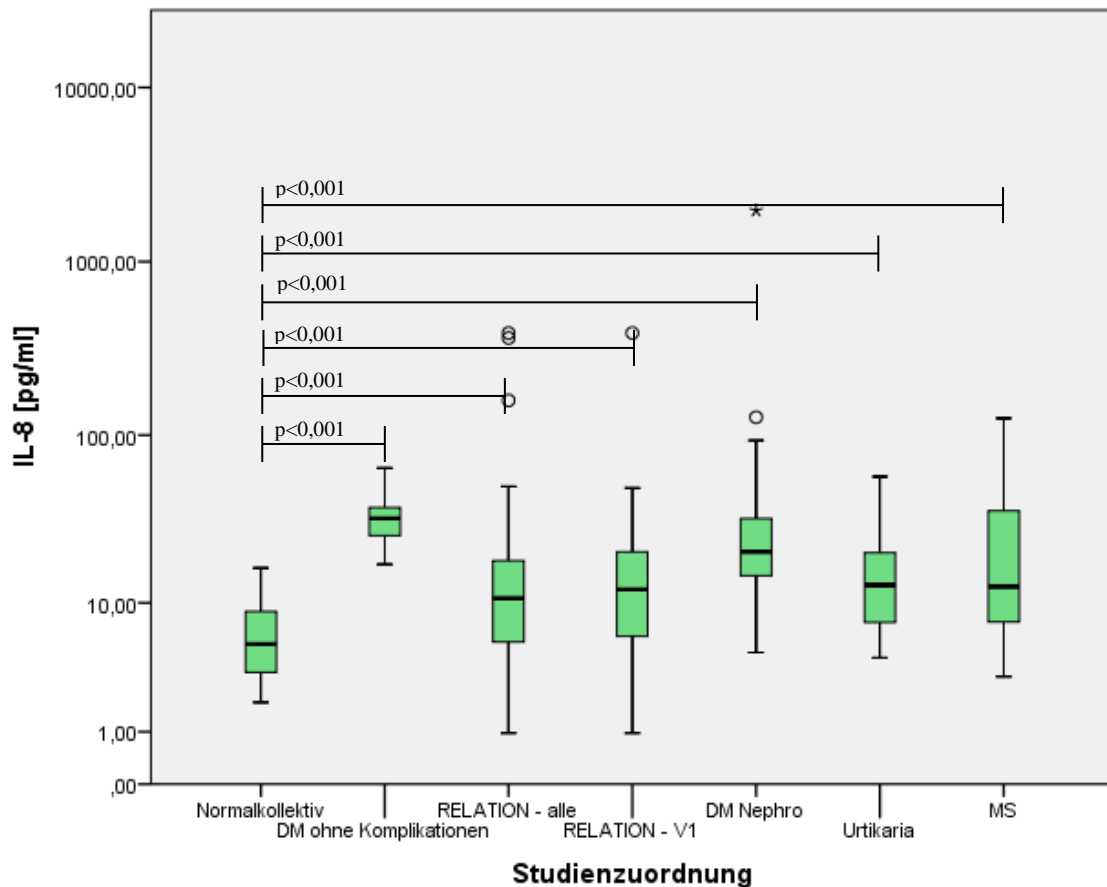


Abbildung 59: Vergleich der IL-8 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Stellt man die Messwerte als Boxplots dar (Abbildung 59), sind die signifikanten Unterschiede zwischen den 6 Gruppen deutlich erkennbar. Die Nullhypothese *Verteilung der Konzentration ist über die Studienzuordnung gleich*, testet man mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben. Der Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni Anpassung zeigt, dass die 0-Hypothese auf dem 0,007-Niveau (0,05/7) abzulehnen ist. Man kann also mit hoher Sicherheit annehmen, dass alle Gruppen eine signifikant höhere IL-8 Konzentration haben als gesunde Probanden.

Testet man die o.g. Nullhypothese innerhalb der Diabetikergruppen (siehe Abbildung 60) zeigt sich, dass Patienten mit DMÖ signifikant niedrigere IL-8 Konzentrationen im Serum haben, als Diabetiker ohne Komplikationen und Patienten mit Nephropathie. Außerdem ergaben die Berechnungen, dass Diabetiker mit Nephropathie gegenüber Patienten mit DMÖ erhöhte IL-8 Konzentrationen haben, aber gegenüber frühen Diabetikern eine signifikant niedrigere IL-8 Konzentration.

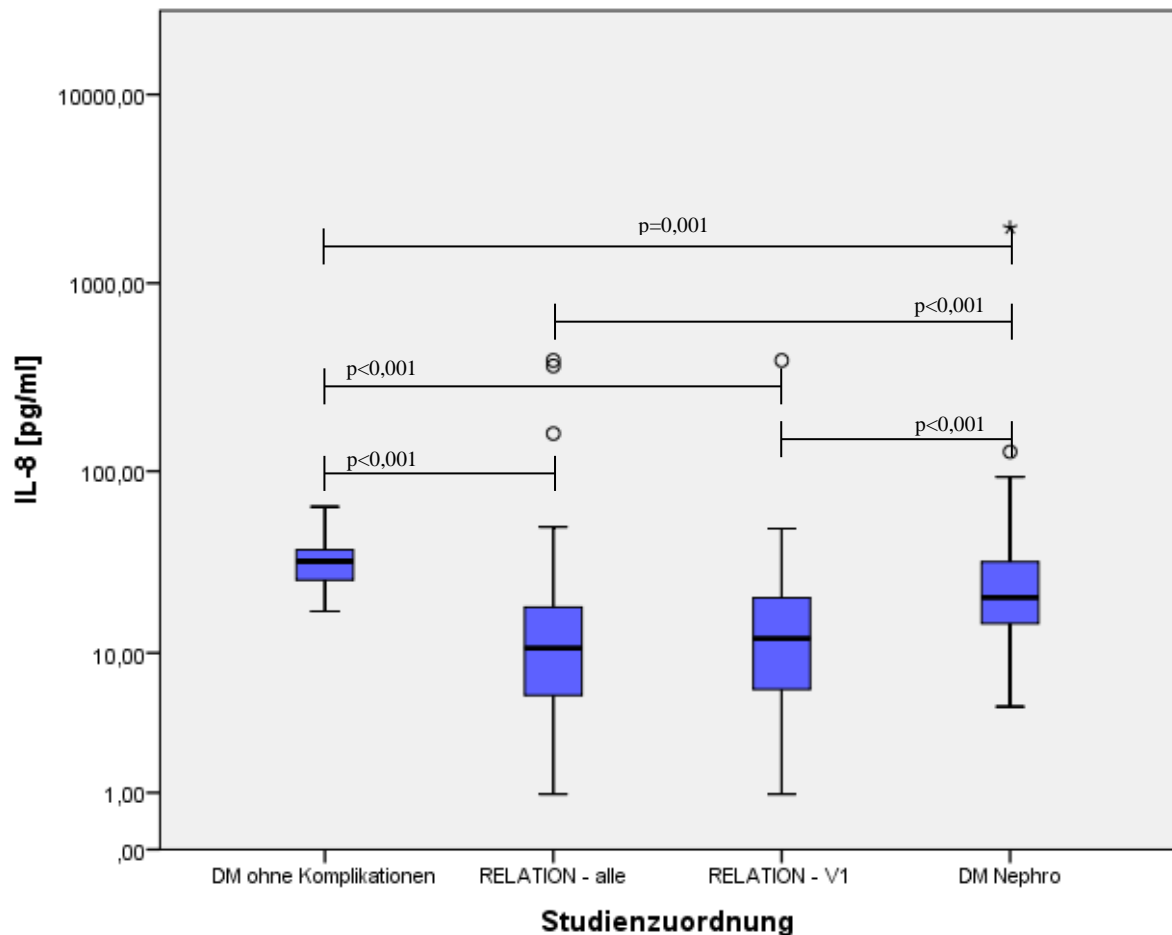


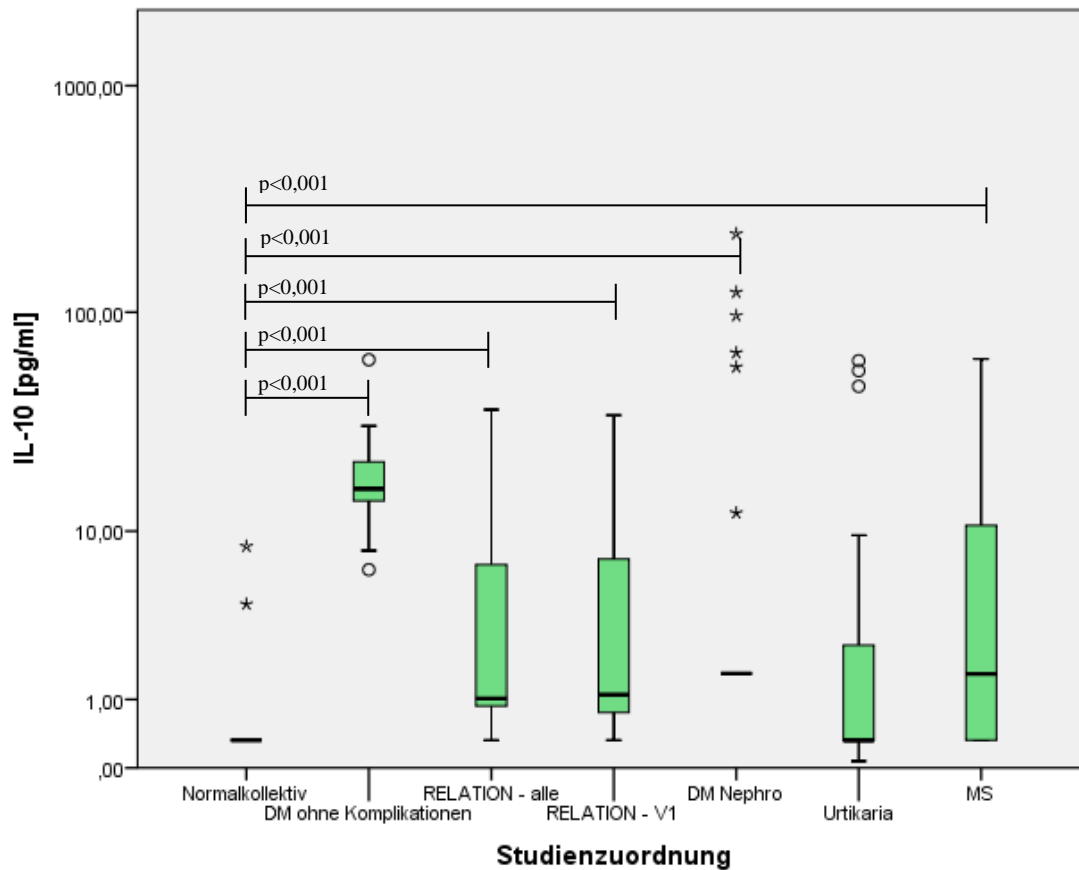
Abbildung 60: Vergleich der IL-8 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.2 IL-10

Einen Überblick der IL-10 Konzentrationen in den Studiengruppen erhält man in Tabelle 66.

IL-10 [pg/ml]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten n (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	0,70	18,66	4,36	2,90	15,10	5,34	7,08	
<b>Median</b>	0,32	15,90	1,02	0,96	1,60	0,32	1,59	
<b>Standardabweichung</b>	1,57	10,13	6,00	3,04	41,91	14,30	13,03	
<b>Varianz</b>	2,47	102,61	36,04	9,22	1756,11	204,37	169,80	
<b>Minimum</b>	0,32	6,44	0,32	0,75	1,60	0,07	0,33	
<b>Maximum</b>	8,43	61,40	36,69	8,22	222,30	60,80	61,87	
<b>Perzentile</b>	25	0,32	13,80	0,86	0,96	1,60	0,32	0,33
	50	0,32	15,90	1,02	0,96	1,60	0,32	1,59
	75	0,32	21,25	6,83	6,04	1,60	2,53	10,89

Tabelle 66: IL-10 Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen



**Abbildung 61: Vergleich der IL-10 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.**

Die IL-10 Konzentrationen sind bei allen Patientengruppen im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht, mit Ausnahme der Urtikaria-Patienten (siehe Abbildung 61). Auffällig ist die sehr hohe IL-10 Konzentration der frühen Diabetiker mit einem Median von 15,90 pg/ml, verglichen mit den anderen Gruppen, deren Median im Bereich von 1 pg/ml liegt.

Dementsprechend lässt sich auch ein signifikanter Unterschied innerhalb der Diabetiker-Gruppen erkennen (Abbildung 62). Die DMÖ Patienten aus der RELATION Studie weisen eine deutlich niedrigere IL-10 Konzentration auf als frühe Diabetiker und Patienten mit Nierenbeteiligung.

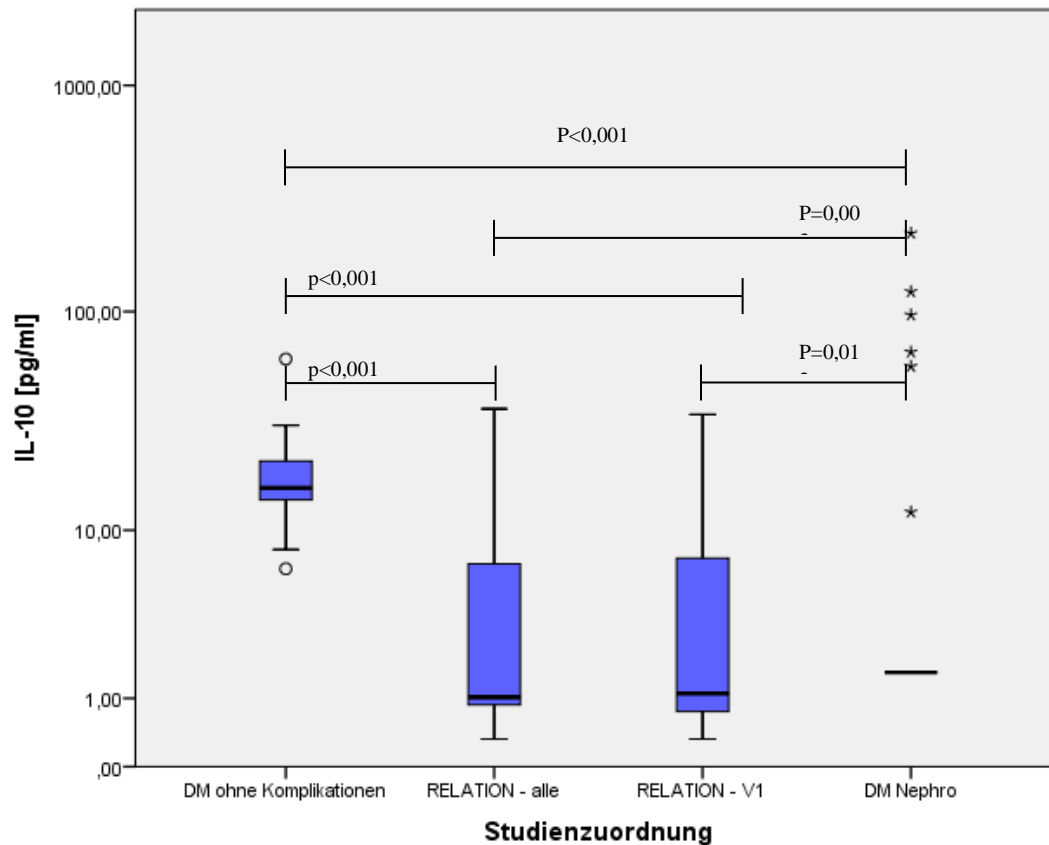


Abbildung 62: Vergleich der IL-10 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.3 IL-17A

In Tabelle 67 sind die IL-17A-Konzentrationen mit dazugehörigem Mittelwert, Median etc. dargestellt.

IL-17A [pg/ml]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=0*)	Relation (DMÖ Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)
<b>Mittelwert</b>	3,62		11,40	12,19	9,29	7,32	39,40
<b>Median</b>	1,60		0,42	0,49	0,47	1,60	14,45
<b>Standardabweichung</b>	4,02		51,34	52,66	25,05	13,98	61,70
<b>Varianz</b>	16,12		2635,68	2772,88	627,51	195,41	3806,49
<b>Minimum</b>	1,60		0,32	0,32	0,32	1,60	0,13
<b>Maximum</b>	20,80		573,59	543,64	149,86	65,92	253,41
<b>Perzentile</b>	25	1,60	0,33	0,33	0,32	1,60	1,45
	50	1,60	0,42	0,49	0,47	1,60	14,45
	75	4,08	4,14	5,20	9,55	5,53	45,68

Tabelle 67: IL-17A Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen.

\*Die Messwerte konnten nicht verwendet werden, da die Kontrollen, die bei jeder Messung als Referenzen eingesetzt werden, außerhalb des vorgesehenen Standardbereichs lagen

Auch bei den IL-17A Konzentrationen zeigen sich einige Unterschiede zwischen den Patientengruppen (siehe Abbildung 63). Die Serumkonzentrationen des Normalkollektivs sind signifikant höher als die der beiden DMÖ Gruppen und der Gruppe der Diabetiker mit Nierenbeteiligung. Die Patienten mit Multipler Sklerose weisen die höchsten IL-17A Serumkonzentration auf, die signifikant höher ist als die IL-17A Serumkonzentration der Probandengruppe.

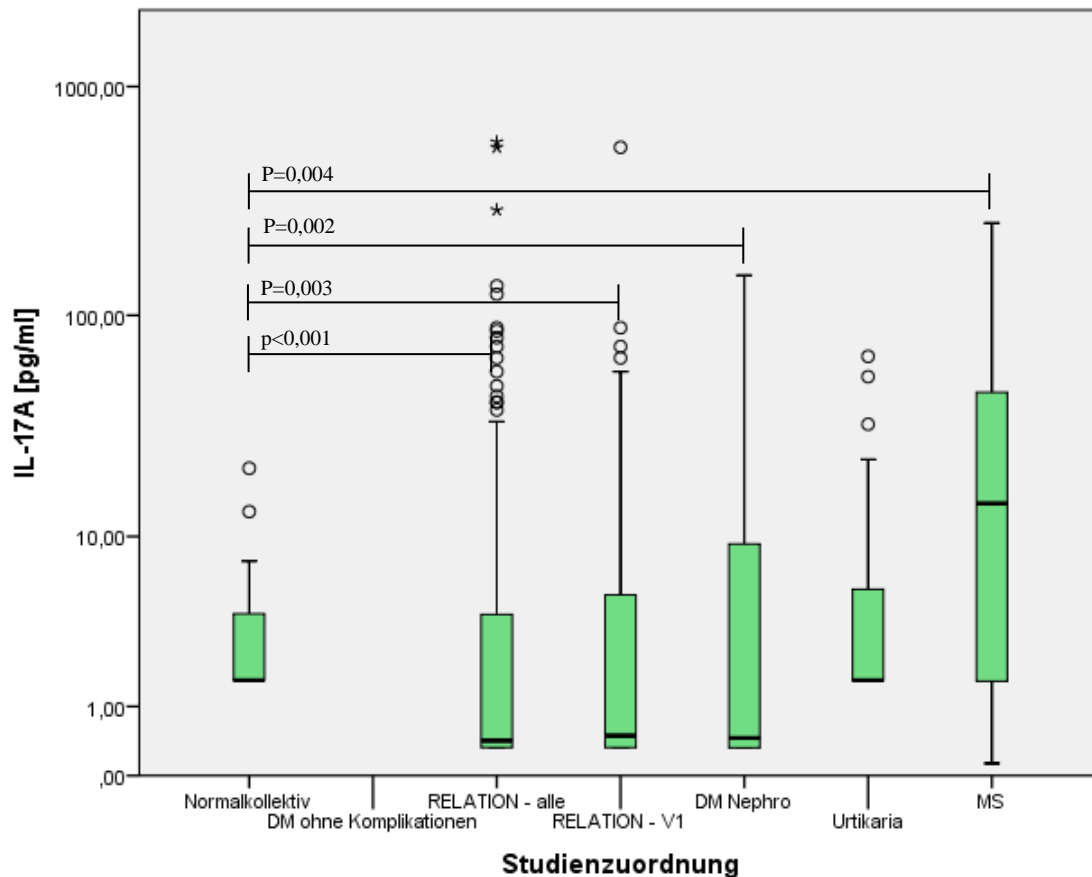


Abbildung 63: Vergleich der IL-17A Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer. Die Messwerte der frühen Diabetiker konnten nicht verwendet werden, da die Kontrollen, die bei jeder Messung als Referenzen eingesetzt werden, außerhalb des vorgesehenen Standardbereichs lagen.

Beim Vergleich der Diabetiker-Gruppen, die in Abbildung 64 dargestellt sind, zeigt sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen Diabetikern mit Nierenbeteiligung und der DMÖ Untergruppe aller Messzeitpunkte. Nach der Bonferroni Anpassung für multiple Tests ist der Unterschied zwischen nierenerkrankten Diabetikern und den DMÖ Patienten zum Studienstart nicht mehr signifikant, wenn auch knapp ( $p=0,028$ , aber durch die Anpassung muss ein  $p$ -Wert von  $0,025$  für eine Signifikanz unterschritten werden).

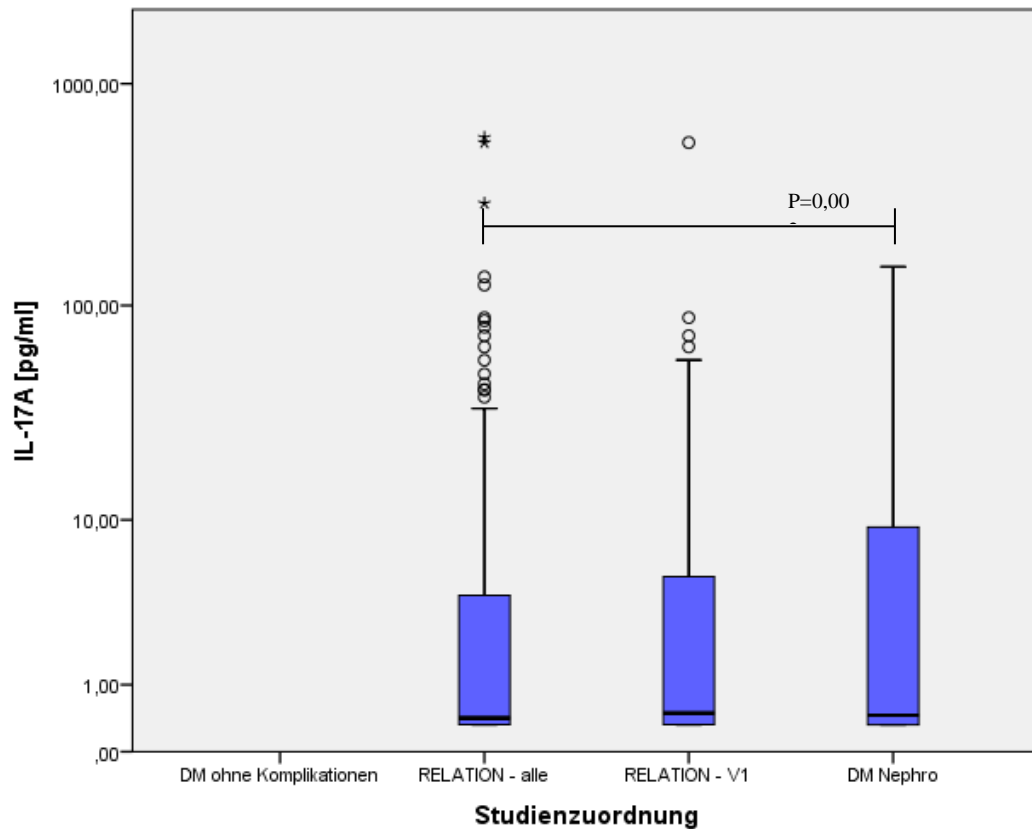


Abbildung 64: Vergleich der IL-17A Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer. Die Messwerte der frühen Diabetiker konnten nicht verwendet werden, da die Kontrollen, die bei jeder Messung als Referenzen eingesetzt werden, außerhalb des vorgesehenen Standardbereichs lagen.

### 3.3.4 MCP-1

Die Ergebnisse zur MCP-1 Messung und die daraus resultierenden Berechnungen sind in Tabelle 68 wiedergegeben.

MCP-1 [pg/ml]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	414,75	883,34	587,36	598,25	1377,54	775,42	433,45	
<b>Median</b>	402,74	898,70	527,24	505,09	1144,11	627,76	406,87	
<b>Standardabweichung</b>	184,68	374,06	330,36	366,47	1251,83	520,51	164,26	
<b>Varianz</b>	34105,79	139920,00	109140,77	134298,10	1567070,31	270927,84	26982,83	
<b>Minimum</b>	120,08	111,21	62,49	95,77	79,36	91,64	103,76	
<b>Maximum</b>	918,30	1635,42	2512,59	2512,59	7816,00	2378,85	910,54	
<b>Perzentile</b>	25	270,52	598,00	375,57	364,83	777,94	432,81	326,76
	50	402,74	898,70	527,24	505,09	1144,11	627,76	406,87
	75	505,82	1088,50	708,60	734,43	1668,47	903,68	537,77

Tabelle 68: MCP-1 Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen

Die MCP-1 Serumkonzentrationen der verschiedenen Patientengruppen unterscheiden sich mit Ausnahme der MS Patienten signifikant von den Konzentrationen gesunder Probanden (siehe Abbildung 65). Im Vergleich zu Gesunden weisen die Serumproben der Diabetiker und Urtikariapatienten signifikant höhere MCP-1 Konzentrationen auf.

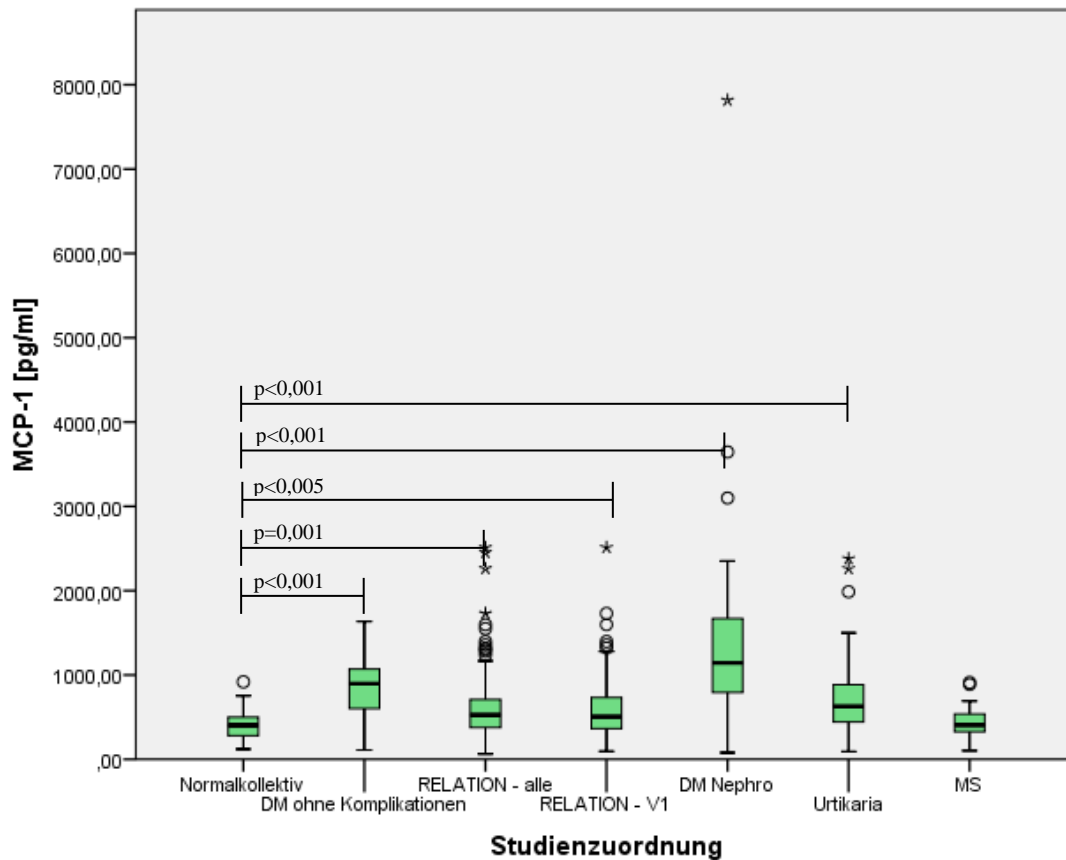


Abbildung 65: Vergleich der MCP-1 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Vergleicht man die Diabetikergruppen miteinander, ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den DMÖ-Patienten und den Diabetikern ohne Komplikationen ( $p < 0,001$ ; Abbildung 66). Die DMÖ Patienten weisen darüber hinaus eine niedrigere Serum-MCP-1 Konzentration als Patienten mit Nierenbeteiligung auf. Frühe Diabetiker und Nephrologiepatienten unterscheiden sich in der MCP-1 Konzentration jedoch nicht signifikant.



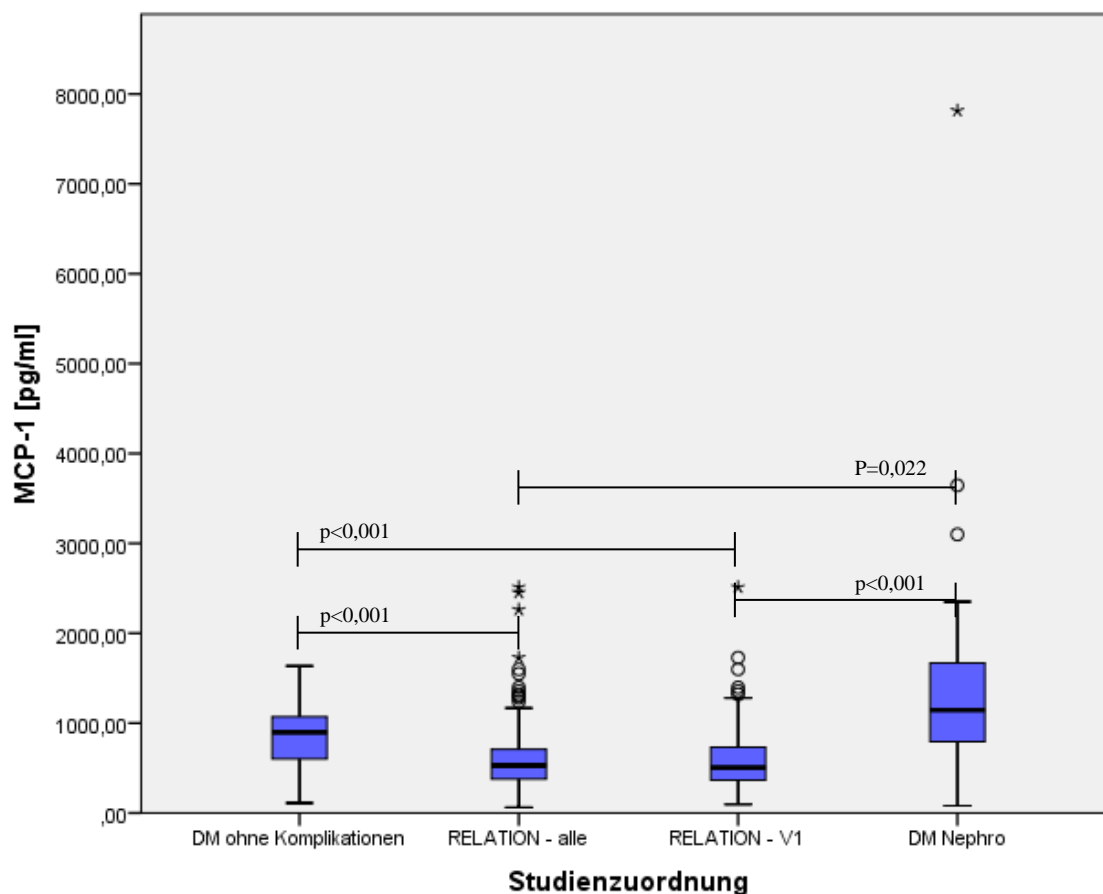


Abbildung 66: Vergleich der MCP-1 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.5 VEGF

Tabelle 69 enthält den Überblick zu den gemessenen VEGF Serumkonzentrationen der verschiedenen Gruppen.

VEGF [pg/ml]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=29)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
Mittelwert	421,56	1045,25	653,71	639,75	1019,44	987,67	1078,64	
Median	359,87	832,80	520,53	520,08	837,21	846,76	703,05	
Standardabweichung	414,41	797,84	592,46	511,97	977,39	740,58	1040,37	
Varianz	171732,77	636549,96	351007,24	262112,82	955293,62	548460,90	1082362,01	
Minimum	20,80	72,14	1,60	1,60	40,00	40,00	109,09	
Maximum	2063,78	4111,12	5582,79	2498,75	4857,31	3201,21	3894,98	
Perzentile	25	142,17	577,37	323,09	321,22	431,13	457,21	307,92
	50	359,87	832,80	520,53	520,08	837,21	846,76	703,05
	75	577,62	1320,41	820,42	843,22	1176,04	1284,78	1350,65

Tabelle 69: VEGF Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen

Alle Krankheitskollektive haben eine signifikant höhere VEGF-Serumkonzentration als die gesunden Probanden (Abbildung 67, Mann-Whitney-U Test mit Bonferroni Anpassung).

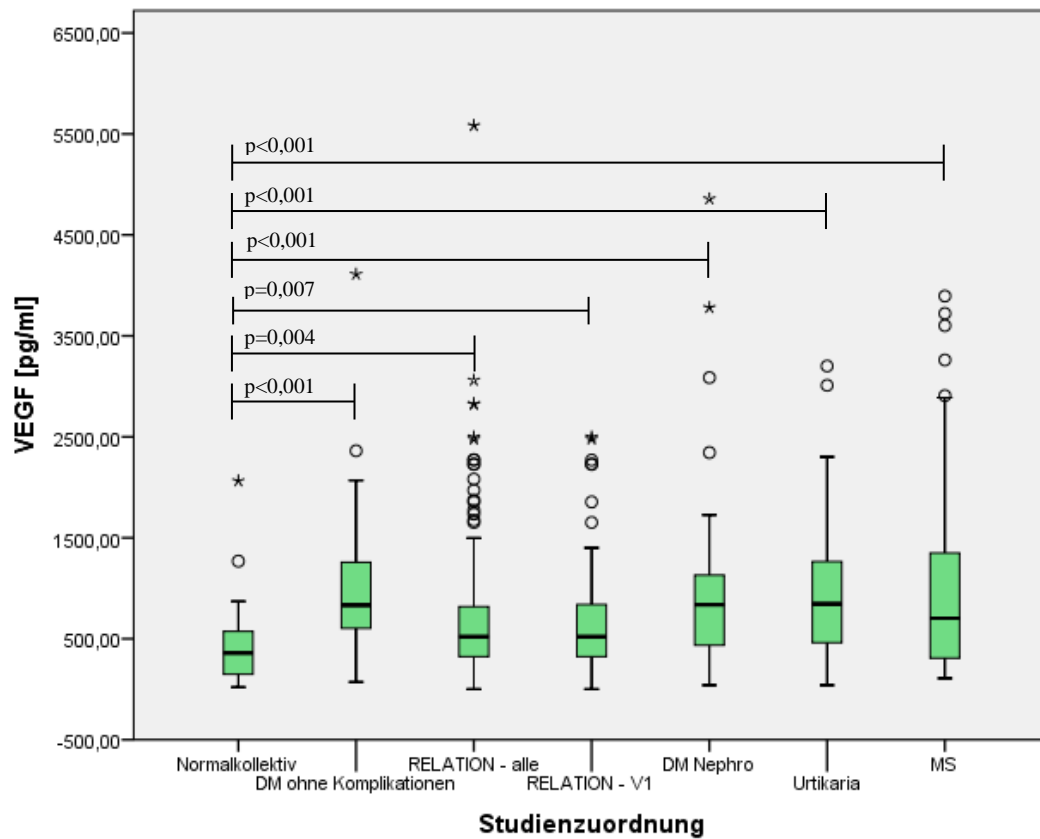


Abbildung 67: Vergleich der VEGF Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Mit Hilfe von Abbildung 68 erkennt man eindeutig, dass Diabetiker ohne Komplikationen (frühe Diabetiker) und Diabetiker mit Nierenbeteiligung signifikant höhere VEGF-Konzentrationen aufweisen als Patienten mit DMÖ. Die VEGF-Serumkonzentrationen früher Diabetiker und Diabetiker mit Nierenbeteiligung unterscheiden sich hingegen nicht signifikant.

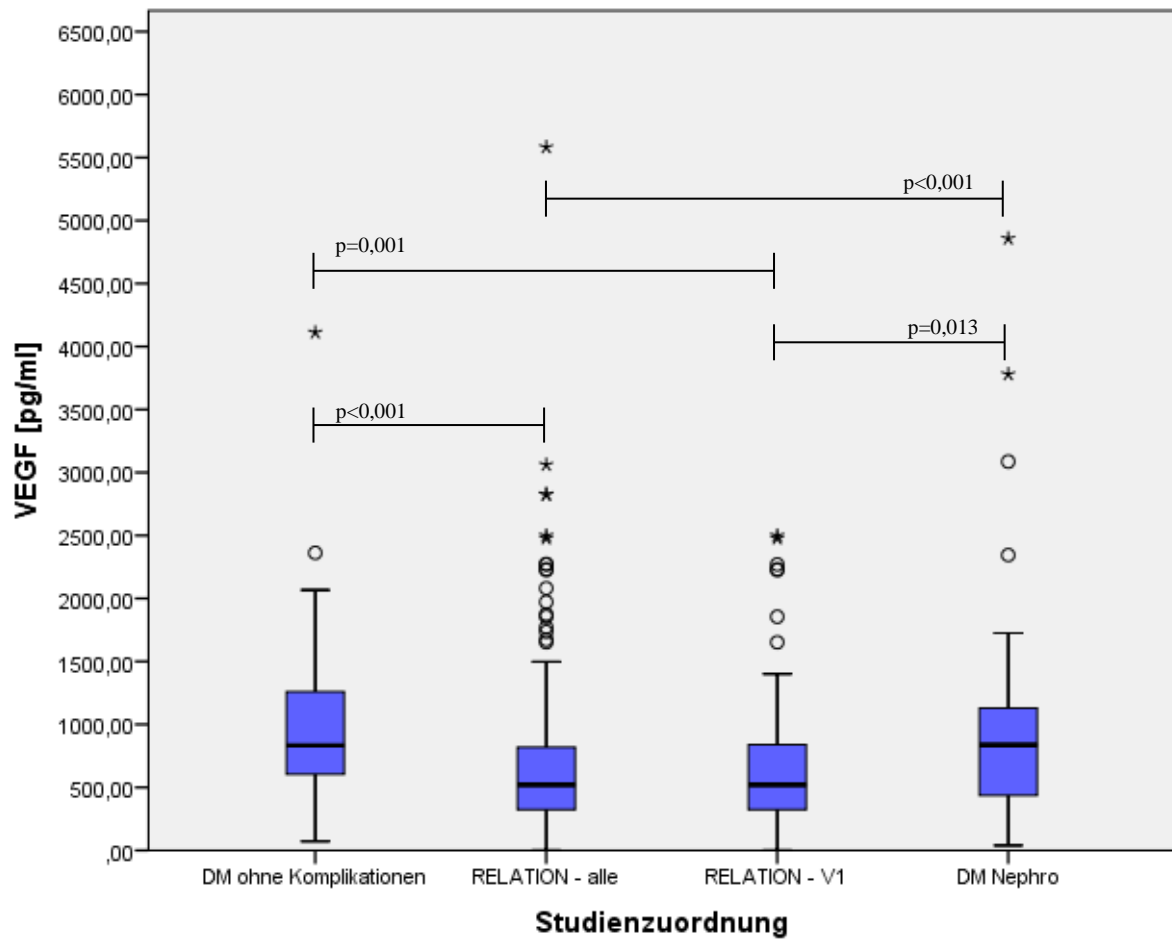


Abbildung 68: Vergleich der VEGF Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

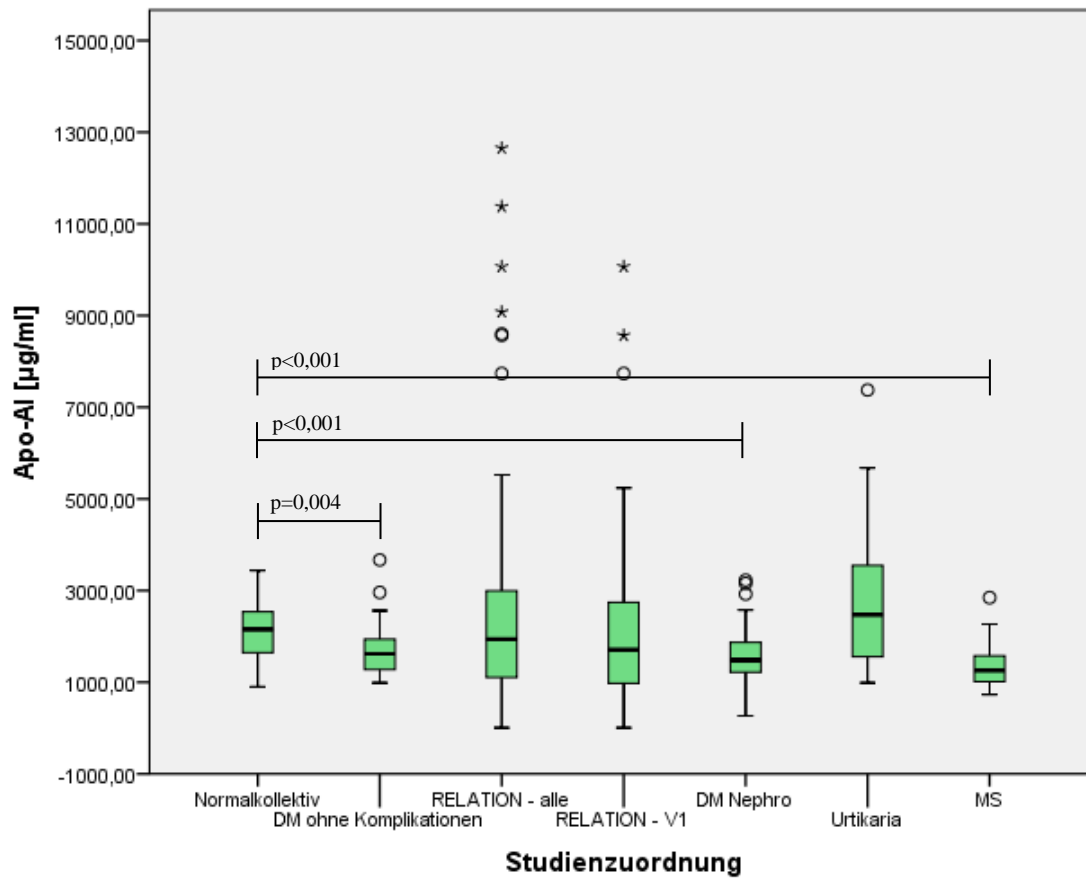
### 3.3.6 Apo-AI

In Tabelle 70 ist der Überblick zu Apo-AI wiedergegeben.

Apo-AI [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMÖ Patienten) (n=291)	RELATION (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	2175,00	1737,14	2251,47	2014,99	1598,30	2750,13	1333,70	
<b>Median</b>	2153,75	1621,50	1937,40	1707,15	1480,25	2474,60	1254,65	
<b>Standardabweichung</b>	639,27	585,18	1740,84	1640,17	607,20	1394,84	429,49	
<b>Varianz</b>	408662,23	342438,06	3030517,80	2690150,97	368690,99	1945592,01	184459,55	
<b>Minimum</b>	897,80	985,80	6,40	6,40	267,20	988,90	733,00	
<b>Maximum</b>	3440,65	3667,90	12652,90	10067,50	3225,20	7375,10	2846,80	
<b>Perzentile</b>	25	1629,55	1274,50	1101,80	971,75	1214,95	1540,10	1009,43
	50	2153,75	1621,50	1937,40	1707,15	1480,25	2474,60	1254,65
	75	2546,95	1947,03	3002,20	2754,93	1874,30	3567,35	1575,90

**Tabelle 70: Apo-AI Konzentrationen in [ $\mu\text{g/ml}$ ] der verschiedenen Gruppen**

Abbildung 69 zeigt in Boxplots die Apo-AI Konzentrationen der verschiedenen Kollektive. Einen signifikanten Unterschied gibt es zwischen Normalkollektiv und frühen Diabetikern, Diabetikern mit Nephropathie und MS-Patienten.



**Abbildung 69:** Vergleich der Apo-AI Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Im Vergleich der verschiedenen Diabetiker-Gruppen zeigt sich lediglich ein signifikanter Unterschied (Abbildung 70). Diabetiker mit Nephropathie haben eine signifikant niedrigere Apo-AI Konzentration als DMÖ Patienten (alle DMÖ-Zeitpunkte zusammengefasst). Betrachtet man nur die Visite 1-Werte der DMÖ Patienten ist kein signifikanter Unterschied zu den anderen Gruppen feststellbar.

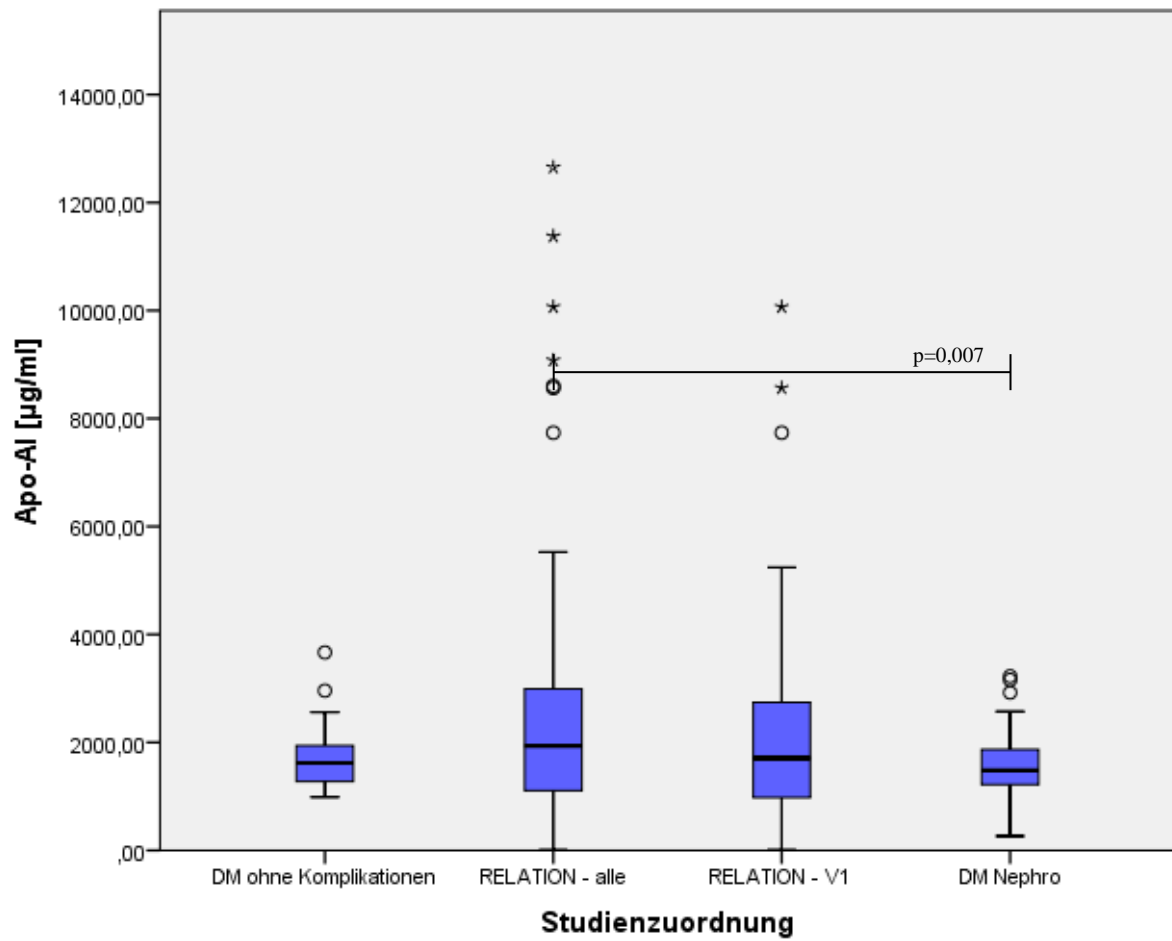


Abbildung 70: Vergleich der Apo-AI Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.7 Apo-AII

Die Verteilung der Apo-AII Konzentrationen und die daraus resultierenden Berechnungen sind in Tabelle 71 wiedergegeben.

Apo-AII [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	745,21	530,98	986,72	963,14	492,77	981,94	366,81	
<b>Median</b>	765,05	419,00	685,80	634,10	473,75	871,80	329,25	
<b>Standardabweichung</b>	286,95	304,22	873,87	1012,11	232,31	627,87	198,46	
<b>Varianz</b>	82338,22	92547,87	763643,15	1024356,70	53966,37	394218,79	39386,11	
<b>Minimum</b>	255,80	157,40	1,22	1,22	27,60	225,80	111,90	
<b>Maximum</b>	1302,00	1653,40	5976,40	5976,40	1115,80	2753,90	1028,20	
<b>Perzentile</b>	25	505,60	337,00	412,10	334,73	336,43	462,35	240,13
	50	765,05	419,00	685,80	634,10	473,75	871,80	329,25
	75	905,79	610,15	1350,85	1207,98	625,05	1287,13	438,48

**Tabelle 71: Apo-AII Konzentrationen in [ $\mu\text{g/ml}$ ] der verschiedenen Gruppen**

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen von Apo-AII kann bei gesunden Probanden verglichen mit Diabetikern ohne Komplikationen, Diabetikern mit Nephropathie und MS-Patienten festgestellt werden (Abbildung 71). Gesunde Probanden haben eine signifikant höhere Apo-AII Serumkonzentration.

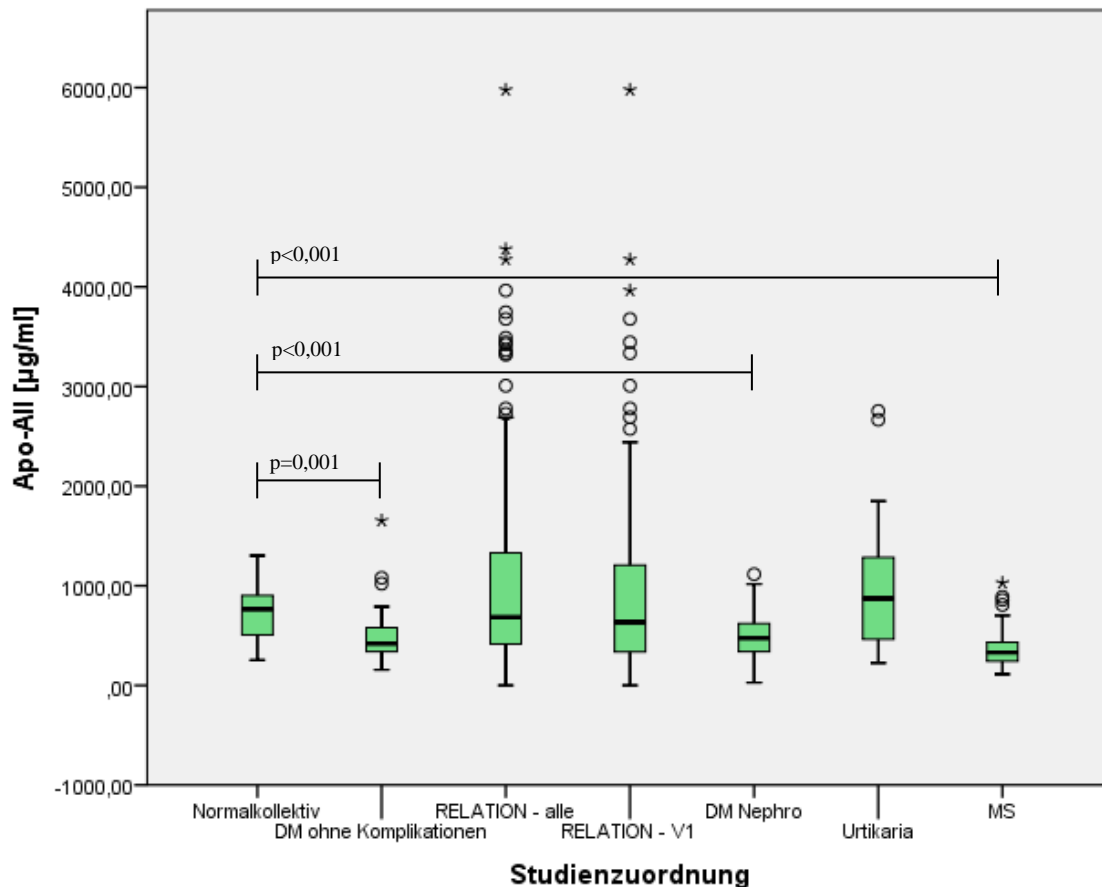


Abbildung 71: Vergleich der Apo-AII Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

In Abbildung 72 aufgetragen sind die Apo-AII Konzentrationen der Diabetikergruppen. Betrachtet man alle RELATION Patienten unabhängig vom Zeitpunkt (RELATION-alle), so liegt eine signifikant höhere Serumkonzentration vor, als bei Diabetikern ohne Komplikationen und Diabetikern mit Nierenbeteiligung ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,021$ ). Es gibt aber keinen signifikanten Unterschied bei der Konzentration von Apo-AII früher Diabetiker und RELATION Patienten, bei denen nur der Visite 1 Werte betrachtet wurden. Die Visite 1 Werte der DMÖ Patienten sind jedoch signifikant höher bei Patienten mit Nephropathie ( $p=0,014$ , Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben mit Bonferroni-Anpassung).



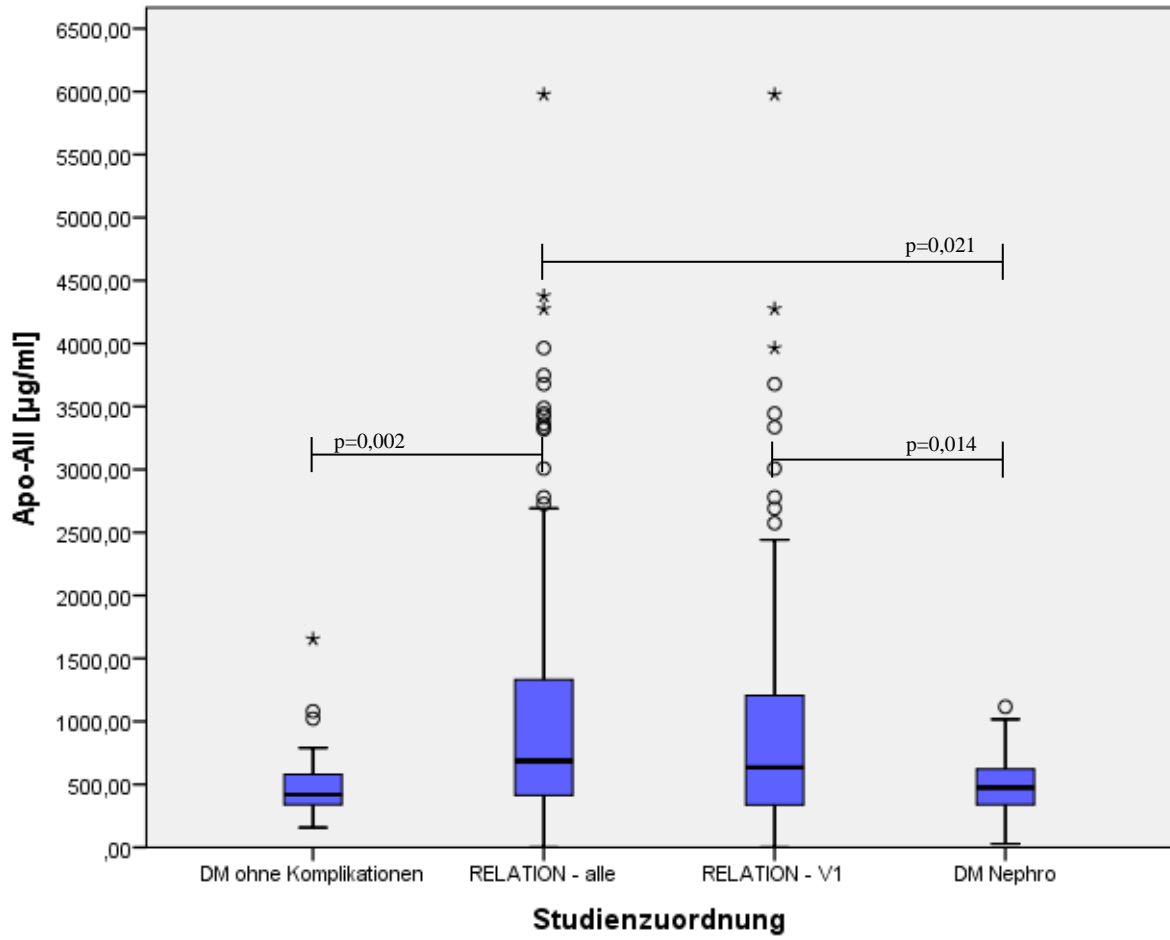


Abbildung 72: Vergleich der Apo-AII Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.8 Apo-B

Eine Übersicht zur Auswertung der Apo-B Konzentrationen der verschiedenen Patientengruppen gibt Tabelle 72 wieder.

Apo-B [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Normalkollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	214,73	109,08	660,49	513,71	91,01	768,73	74,09	
<b>Median</b>	149,23	70,90	148,00	177,70	65,70	337,25	54,90	
<b>Standardabweichung</b>	176,43	171,68	2504,49	872,96	72,16	1412,59	71,71	
<b>Varianz</b>	31127,94	29474,39	6272462,08	762054,98	5206,35	1995410,85	5142,62	
<b>Minimum</b>	42,10	4,93	0,00	0,00	24,64	4,93	0,00	
<b>Maximum</b>	739,80	946,90	38033,73	5204,60	319,80	7289,40	318,90	
<b>Perzentile</b>	25	93,20	23,80	64,10	75,10	41,19	112,70	27,70
	50	149,23	70,90	148,00	177,70	65,70	337,25	54,90
	75	246,24	111,30	457,07	546,90	122,30	675,40	87,88

Tabelle 72: Apo-B Konzentrationen in [ $\mu\text{g/ml}$ ] der verschiedenen Gruppen

Die Apo-B Konzentrationen von gesunden Probanden sind signifikant höher als von Patienten mit frühem Diabetes, Patienten aus der Nephrologie und Patienten mit MS (Abbildung 73,  $p < 0,001$ ).

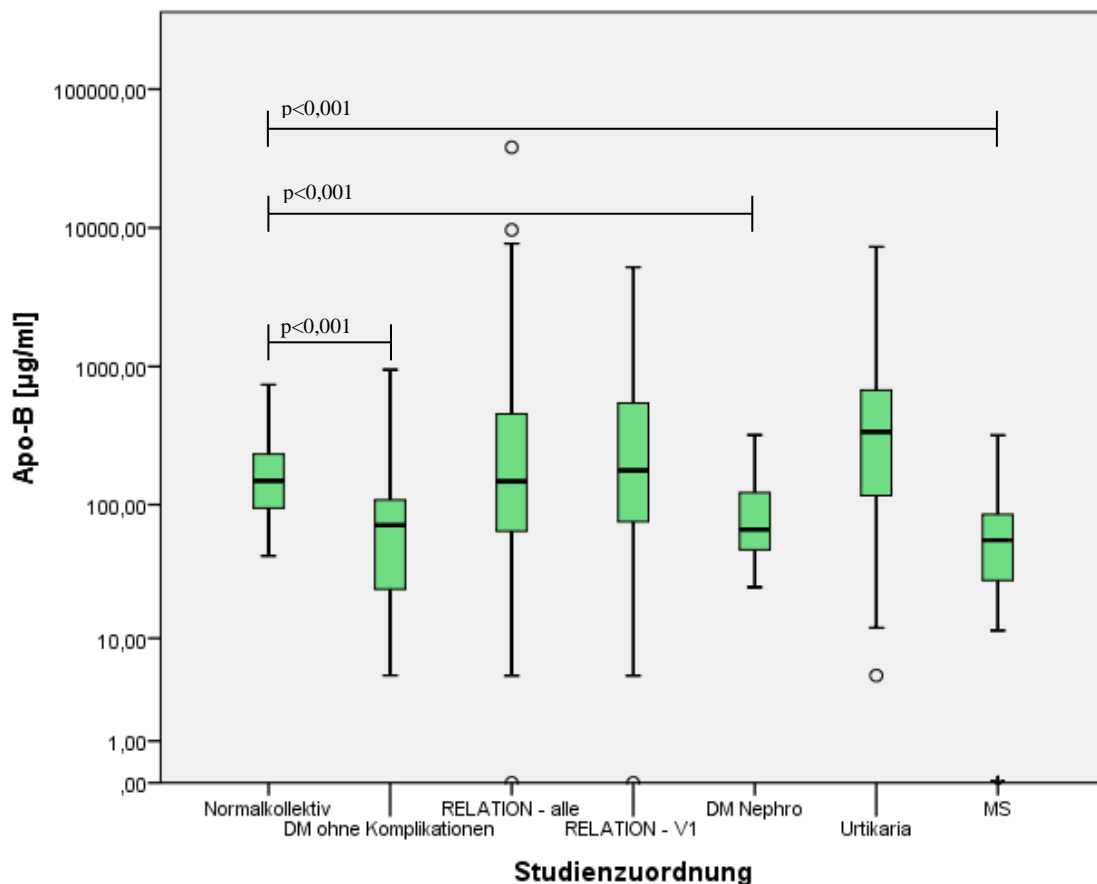


Abbildung 73: Vergleich der Apo-B Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] zwischen den Kollektiven. Kreise markieren Ausreißer.

Beim Vergleich der Diabetespatienten (Abbildung 74) fällt auf, dass es im Gegensatz zu den bis jetzt genannten Apolipoproteinen zwischen fast allen Gruppen einen signifikanten Unterschied gibt. Die DMÖ Patienten haben signifikant höhere Konzentrationen an Apo-B im Serum als Patienten mit frühem Diabetes (ohne Komplikationen) oder Diabetiker mit Nephropathie ( $p < 0,001$ ). Diabetiker ohne Komplikationen und Diabetiker mit Nephropathie weisen keine Unterschiede in der Serumkonzentration auf.

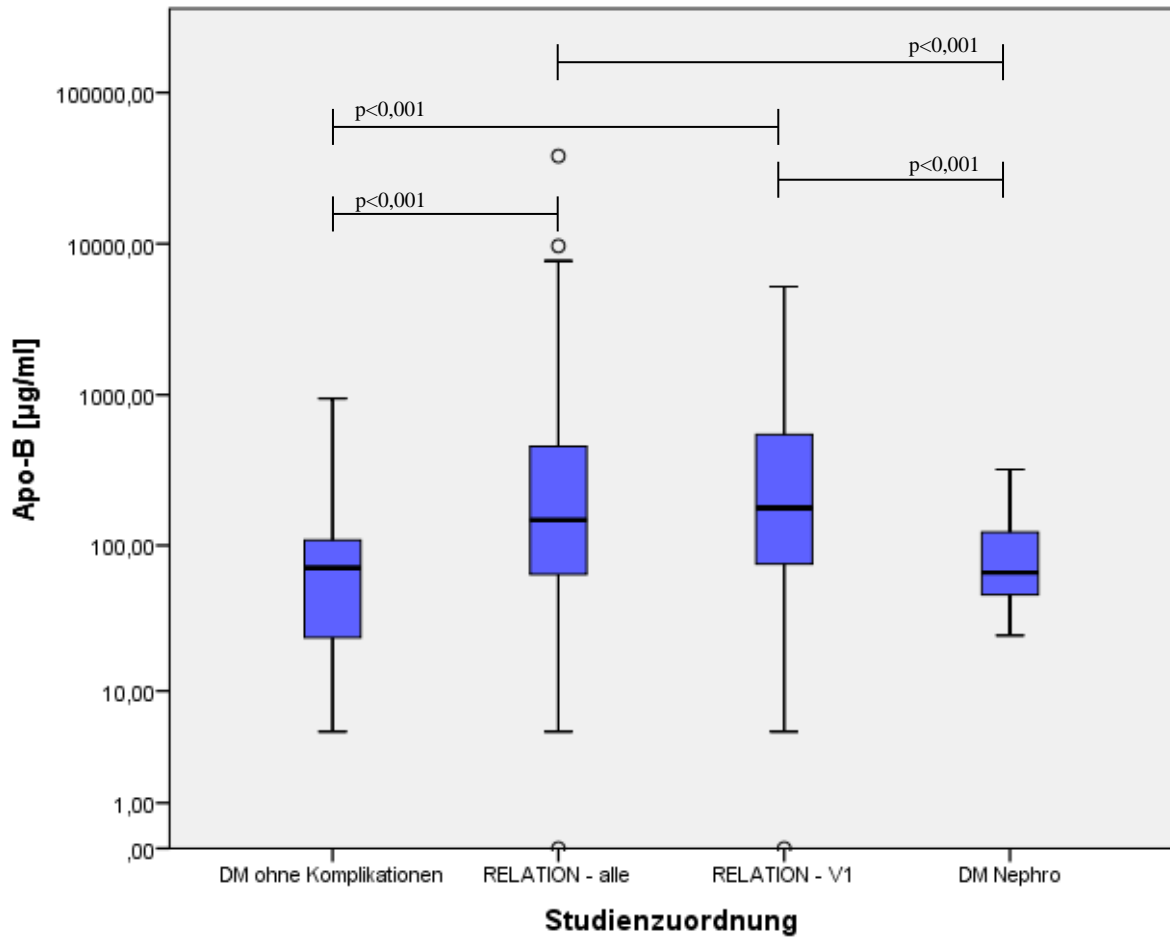


Abbildung 74: Vergleich der Apo-B Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

### 3.3.9 Apo-CII

Die Apo-CII Messergebnisse der verschiedenen Gruppen vermittelt Tabelle 73.

Apo-CII [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	251,17	185,17	442,64	375,23	264,15	550,51	94,84	
<b>Median</b>	152,48	110,80	164,70	116,30	177,60	235,55	61,65	
<b>Standardabweichung</b>	305,39	226,13	657,29	625,80	205,09	708,12	118,22	
<b>Varianz</b>	93265,98	51132,92	432033,28	391619,57	42062,89	501434,19	13976,12	
<b>Minimum</b>	30,20	32,70	0,09	0,09	11,50	39,30	11,40	
<b>Maximum</b>	1433,80	1228,00	3431,90	3115,63	933,90	2800,00	627,20	
<b>Perzentile</b>	25	82,85	80,35	72,10	53,28	118,53	81,55	31,63
	50	152,48	110,80	164,70	116,30	177,60	235,55	61,65
	75	256,83	207,08	488,20	345,95	349,93	744,55	83,20

**Tabelle 73: Apo-CII Konzentrationen in [ $\mu\text{g/ml}$ ] der verschiedenen Gruppen**

In Abbildung 75 sind die Ergebnisse der Apo-CII Messung in Boxplots aufgetragen. Es ist lediglich ein signifikanter Unterschied vorhanden bei den Serumkonzentrationen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden ( $p > 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben mit Bonferroni-Anpassung).

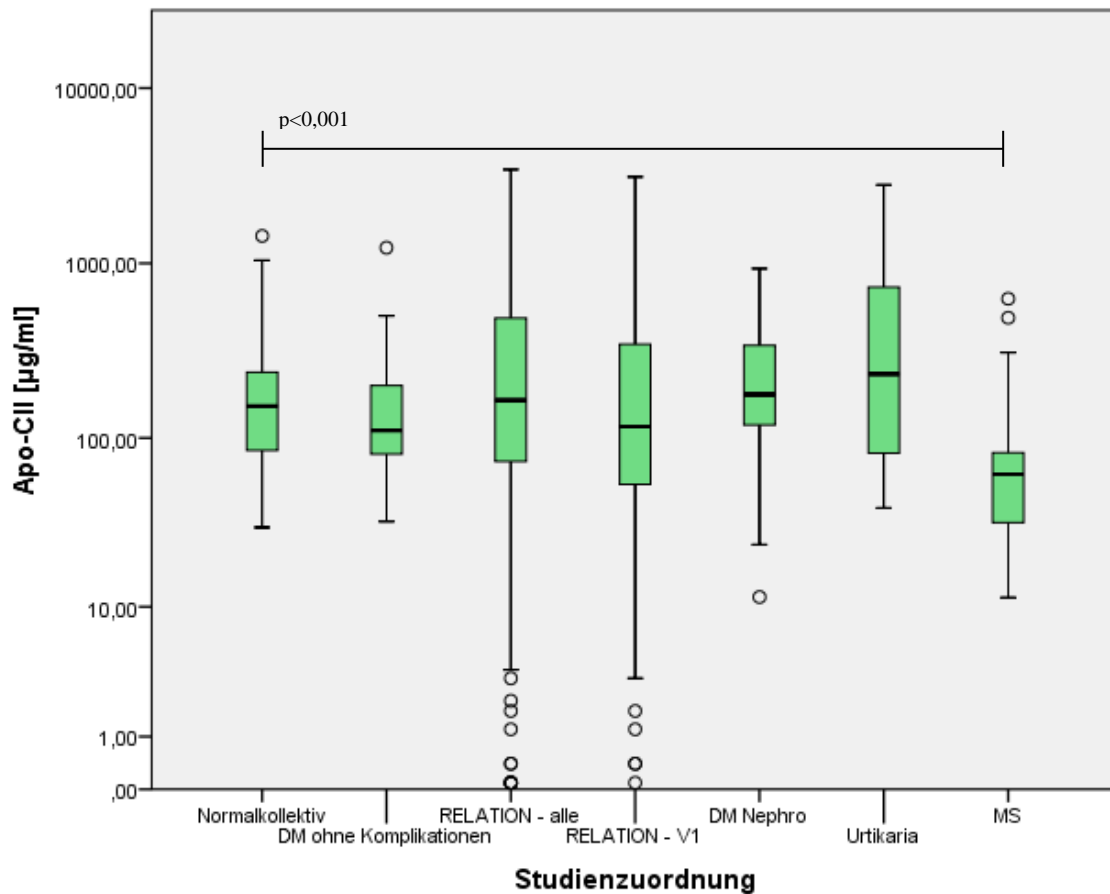


Abbildung 75: Vergleich der Apo-CII Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

Vergleicht man die Diabetesgruppen untereinander, ergibt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 76). Lediglich Diabetiker ohne Komplikationen haben eine signifikant niedrigere Apo-CII Serumkonzentration als Diabetiker mit Nierenbeteiligung ( $p=0,004$ ). Ansonsten gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

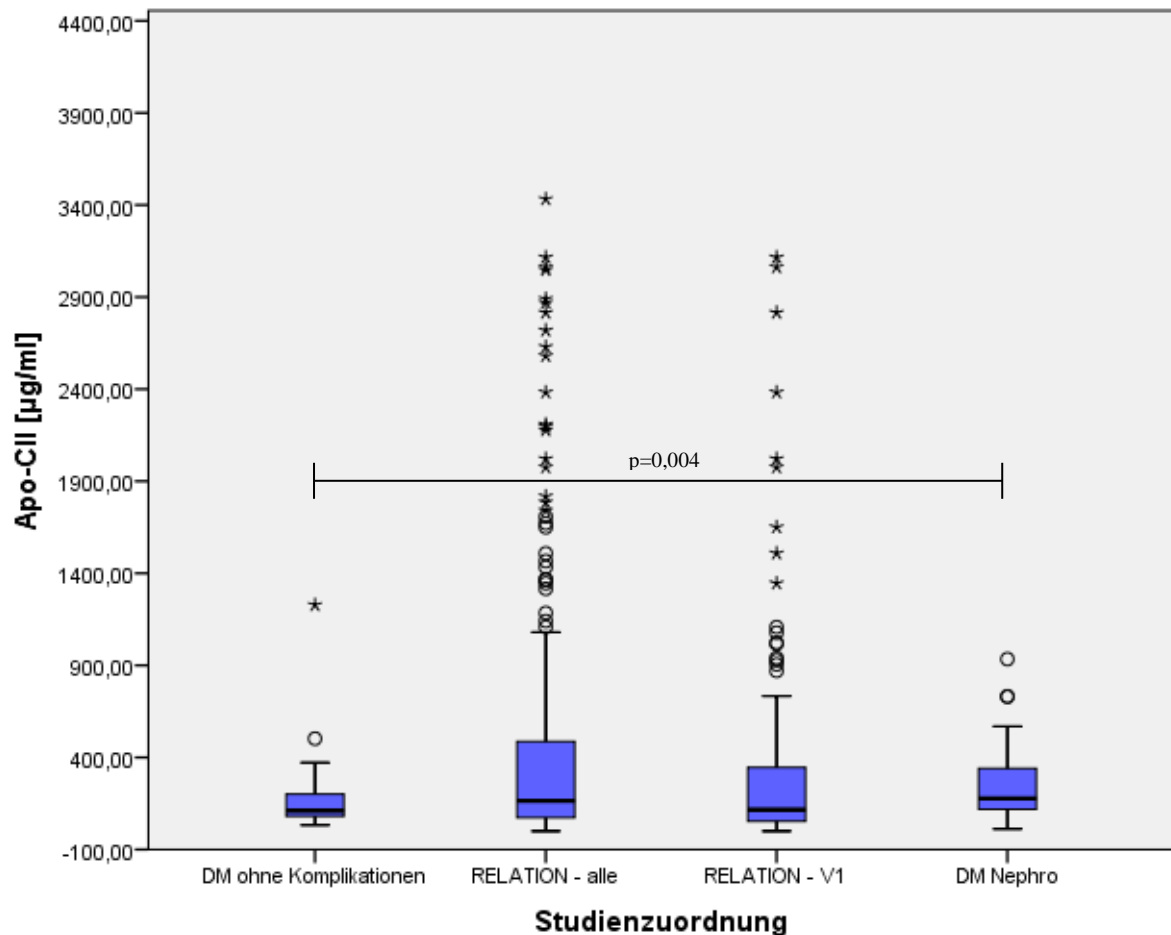


Abbildung 76: Vergleich der Apo-CII Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.10 Apo-CIII

In Tabelle 74 sind die Ergebnisse der Apo-CIII Messungen und Berechnungen dargestellt.

Apo-CIII [µg/ml]	Normal-kollektiv (n=31)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMÖ Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=39)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)
Mittelwert	749,43	447,65	4010,67	5235,26	806,26	1262,41	260,50
Median	255,20	277,95	349,30	487,30	667,90	572,60	162,65
Standardabweichung	1625,27	490,38	9455,36	10631,63	532,05	1823,93	359,52
Varianz	2641490,11	240469,77	89403761,28	113031515,50	283077,09	3326734,09	129256,40
Minimum	76,90	45,80	0,27	1,30	19,90	109,80	43,90
Maximum	8400,00	2787,10	42000,00	42000,00	2135,30	8400,00	1823,60
Perzentile	25	157,10	244,83	186,00	199,58	404,90	245,30
	50	255,20	277,95	349,30	487,30	667,90	572,60
	75	462,80	573,83	1212,50	4563,35	1146,35	1200,90

Tabelle 74: Apo-CIII Konzentrationen in [µg/ml] der verschiedenen Gruppen

Im Vergleich zum Normalkollektiv haben Patienten mit Nephropathie eine signifikant höhere Konzentration an Serum Apo-CIII (Abbildung 77,  $p=0,001$ ). Bei MS-Patienten hingegen wurde eine signifikant niedrigere Konzentration von Apo-CIII im Serum verglichen mit Gesunden ( $p=0,002$ ) festgestellt (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben mit Bonferroni-Anpassung).

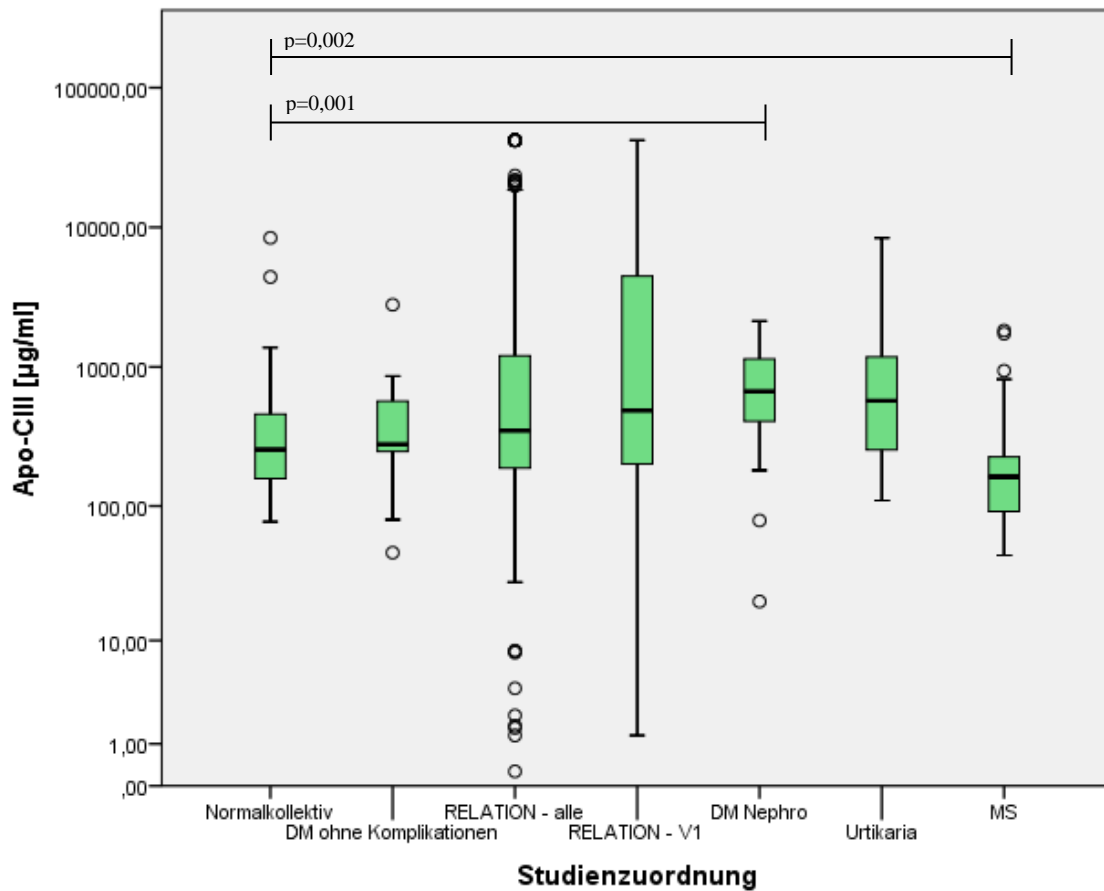


Abbildung 77: Vergleich der Apo-CIII Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

Diabetiker ohne Komplikationen weisen eine signifikant niedrigere Apo-CIII Konzentration auf, als Patienten mit diabetischer Nephropathie ( $p=0,021$ ). Darüber hinaus unterscheiden sich die Nephropathiepatienten signifikant von den RELATION Patienten, wenn man alle Zeitpunkte zusammenfasst ( $p<0,001$ ), aber nicht, wenn man nur die Visite 1 betrachtet. Die Nephrologiepatienten haben im Median die höchsten Apo-CIII Werte.

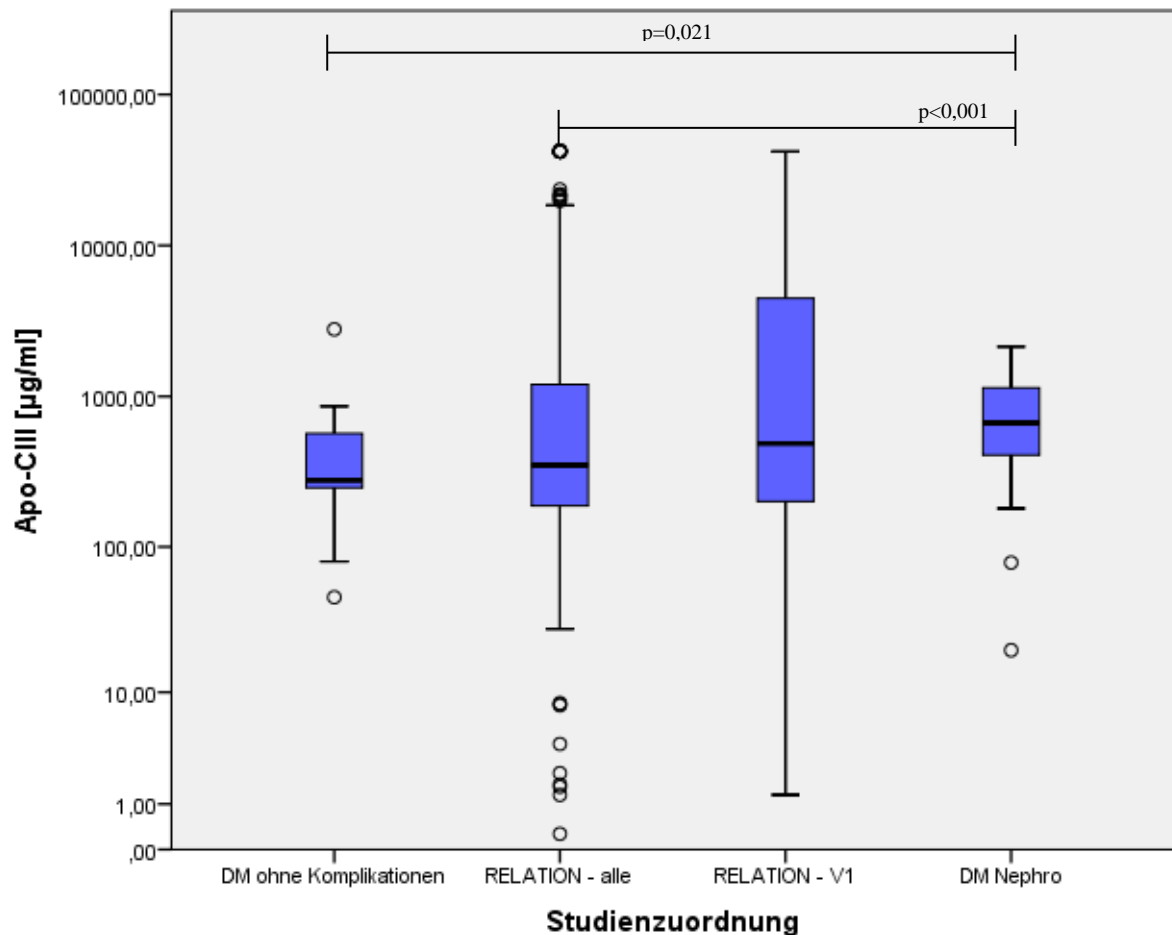


Abbildung 78: Vergleich der Apo-CIII Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

### 3.3.11 Apo-E

Einen Überblick zu den Ergebnissen und Berechnungen der Serum Apo-E Messung gibt Tabelle 75.

Apo-E [µg/ml]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)
Mittelwert	195,47	147,67	335,09	225,48	181,01	426,44	89,57
Median	107,35	91,70	109,90	100,10	103,80	233,35	52,65
Standardabweichung	212,16	162,25	616,29	346,69	263,41	481,98	98,97
Varianz	45013,24	26323,51	379809,35	120191,83	69385,38	232305,78	9795,46
Minimum	21,50	31,80	0,22	0,30	24,00	31,60	20,20
Maximum	753,10	859,10	7000,00	2176,20	1542,20	1400,00	498,50
Perzentile	25	69,15	55,70	53,35	42,88	62,33	37,48
	50	107,35	91,70	109,90	100,10	103,80	52,65
	75	202,54	186,10	328,30	242,78	164,20	83,68

Tabelle 75: Apo-E Konzentrationen in [µg/ml] der verschiedenen Gruppen



Nur zwischen gesunden Probanden und Patienten, die an MS erkrankt sind, gibt es einen signifikanten Unterschied bei den Apo-E Serumkonzentrationen (Abbildung 79,  $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben, Bonferroni angepasst). Bei MS-Patienten wurde im Median eine niedrigere Apo-E Konzentration im Serum gemessen.

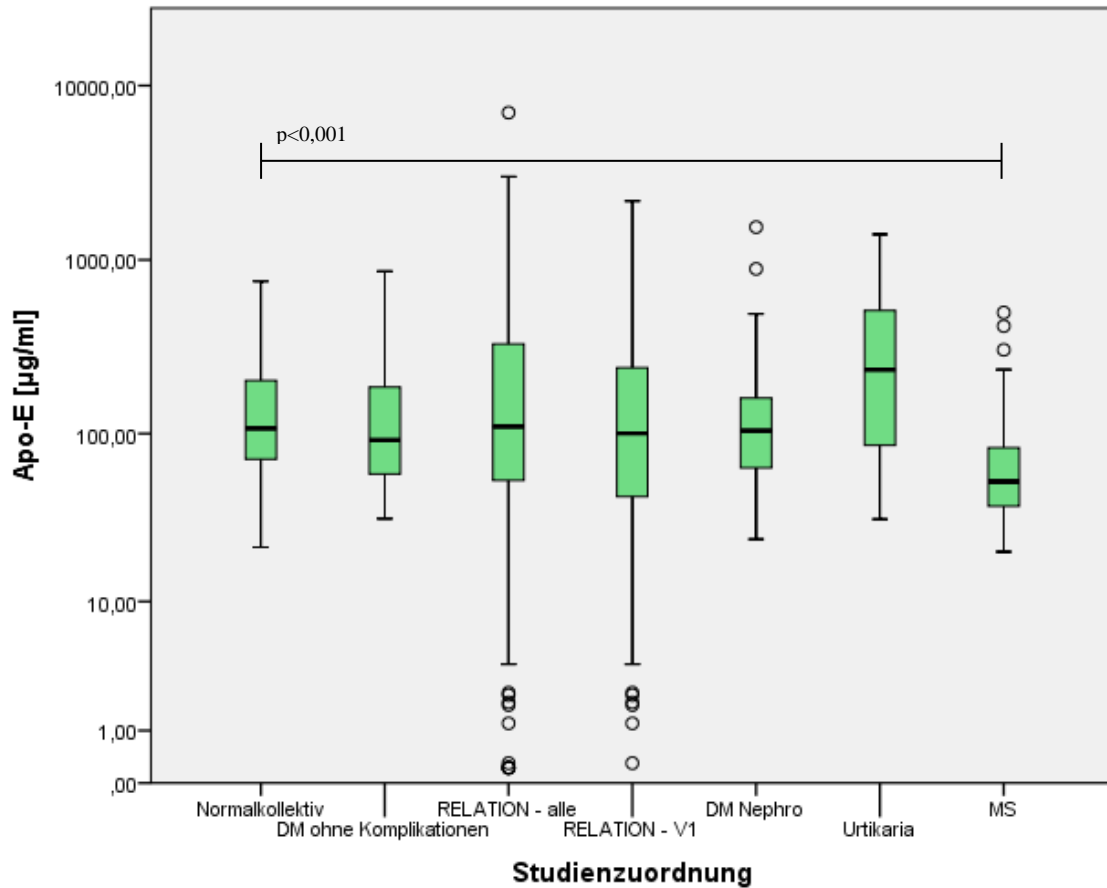


Abbildung 79: Vergleich der Apo-E Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

Es gibt darüber hinaus keine Unterschiede in der Apo-E Serumkonzentration zwischen den verschiedenen Diabetesgruppen (Abbildung 80).

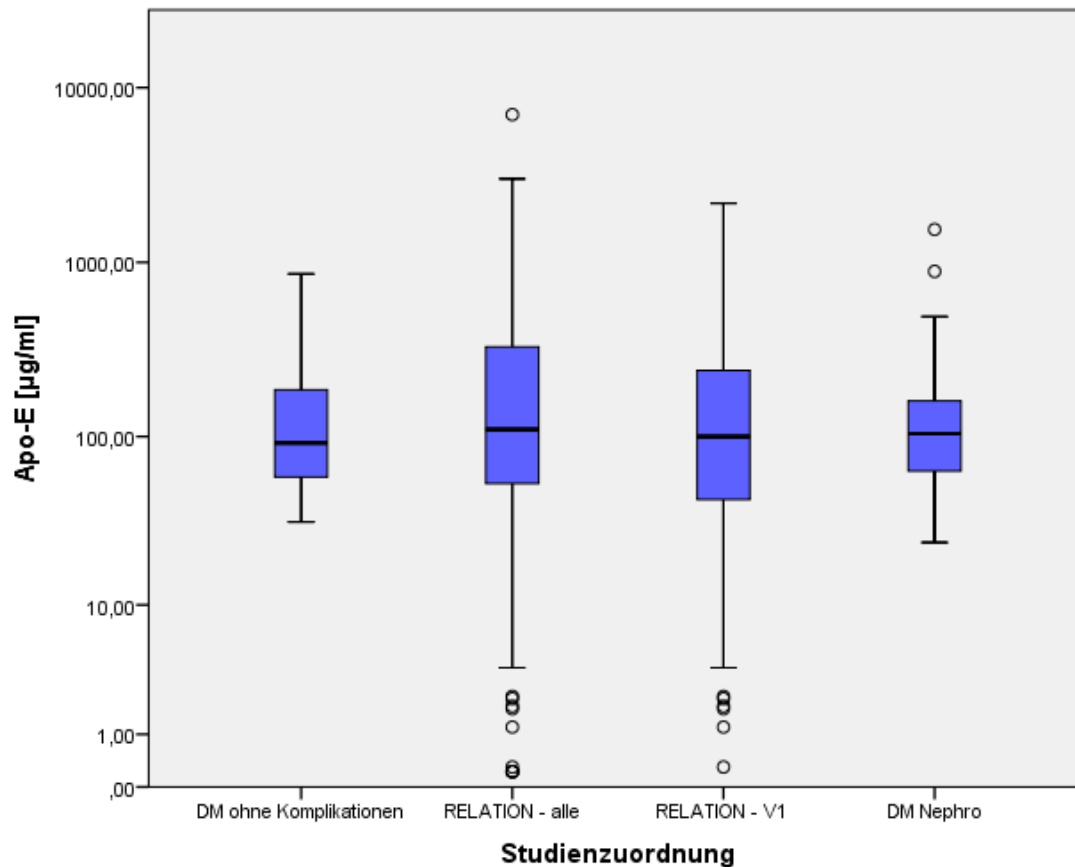


Abbildung 80: Vergleich der Apo-E Konzentrationen [µg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise markieren Ausreißer.

### 3.3.12 sVCAM-1

In Tabelle 76 sind die Ergebnisse der sVCAM-1 Messung dargestellt.

sVCAM-1 [ng/ml]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=41)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	1146,77	3359,91	1542,56	1741,68	5416,08	2605,84	2955,39	
<b>Median</b>	1122,11	3412,15	1437,11	1567,54	4928,17	2168,74	2914,00	
<b>Standardabweichung</b>	368,51	999,13	919,01	1180,59	2202,43	1548,25	1473,65	
<b>Varianz</b>	135802,23	998258,22	844570,75	1393790,26	4850681,37	2397072,82	2171637,28	
<b>Minimum</b>	407,58	1836,84	3,05	21,91	2265,88	780,06	181,24	
<b>Maximum</b>	1854,13	5434,76	6163,40	6163,40	10547,14	6838,31	7815,35	
<b>Perzentile</b>	25	893,13	2381,42	1012,81	988,02	3709,51	1345,67	1896,32
	50	1122,11	3412,15	1437,11	1567,54	4928,17	2168,74	2914,00
	75	1462,11	4138,40	1889,27	2118,61	6945,65	3641,97	3717,82

Tabelle 76: sVCAM-1 Konzentrationen in [ng/ml] der verschiedenen Gruppen

Trägt man die gemessenen sVCAM-1 Werte als Boxplots auf (Abbildung 81), sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen leicht erkennbar. Alle Krankheitsgruppen weisen einen

signifikanten Unterschied zu gesunden Personen auf (zwischen  $p < 0,001$  und  $p = 0,007$ , siehe Abbildung 81), deren Serumkonzentration signifikant niedriger ist. Die höchsten Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Gruppen ergeben sich bei Diabetikern ohne Komplikationen und Diabetikern mit Nierenbeteiligung.

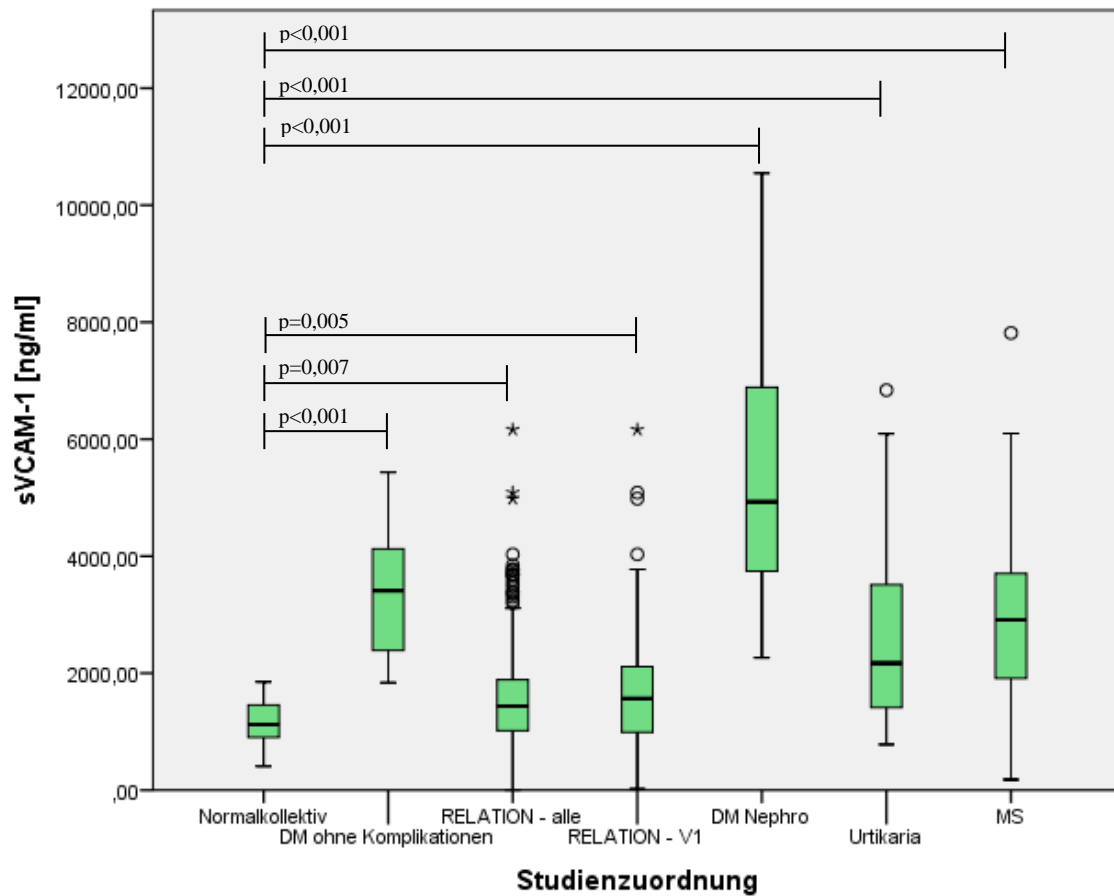


Abbildung 81: Vergleich der sVCAM-1 Konzentrationen [ng/ml] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

Deutliche Unterschiede lassen sich auch bei den sVCAM-1 Serumkonzentrationen feststellen, wenn man die Diabetiker betrachtet (Abbildung 82). Die niedrigsten Konzentrationen weisen die beiden RELATION DMÖ Subgruppen auf, die sich signifikant von frühen Diabetikern und den Nephrologiepatienten unterscheiden. Die Diabetiker mit Nierenbeteiligung haben die höchste Konzentration von sVCAM-1, die außerdem signifikant höher ist als die Serumkonzentration von Diabetikern ohne Komplikationen.

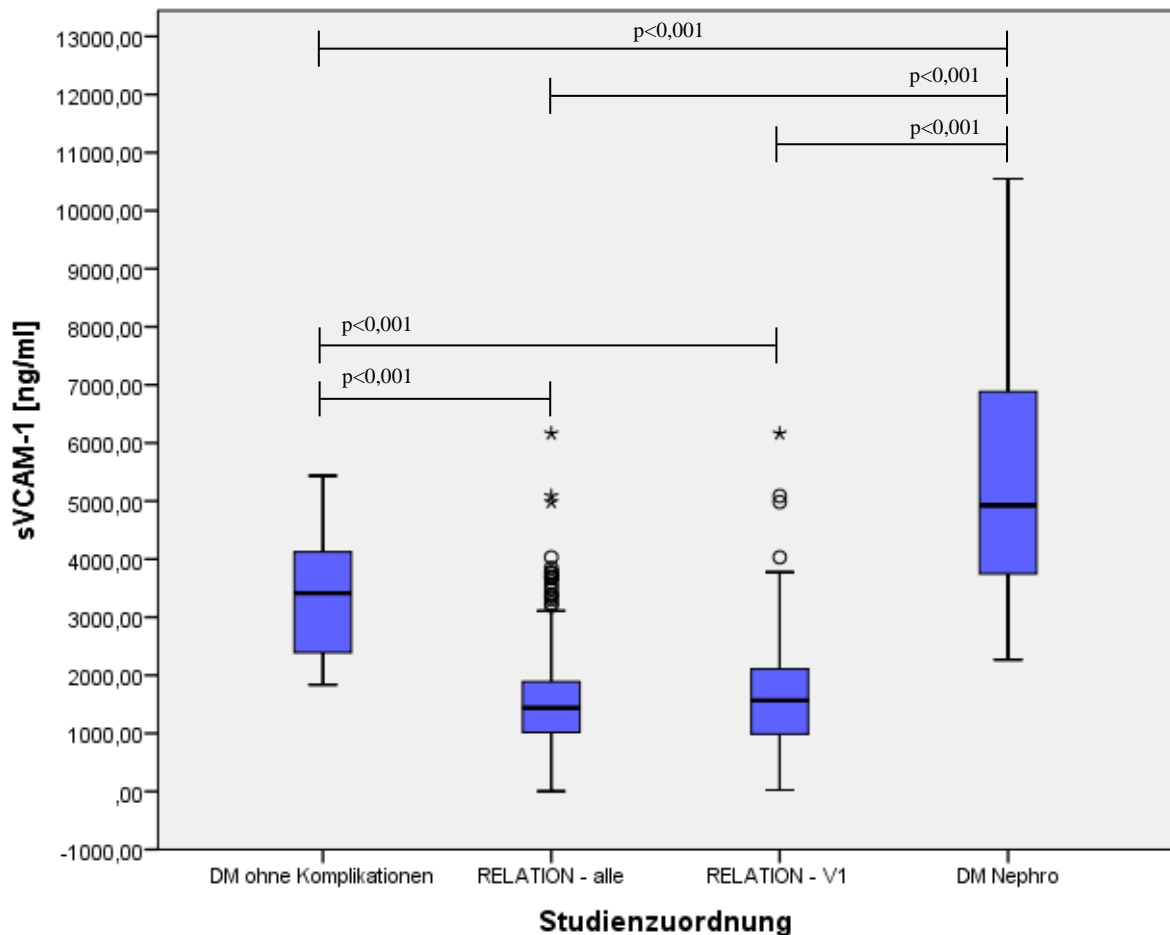


Abbildung 82: Vergleich der sVCAM-1 Konzentrationen [ng/ml] zwischen den Diabetesgruppen. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

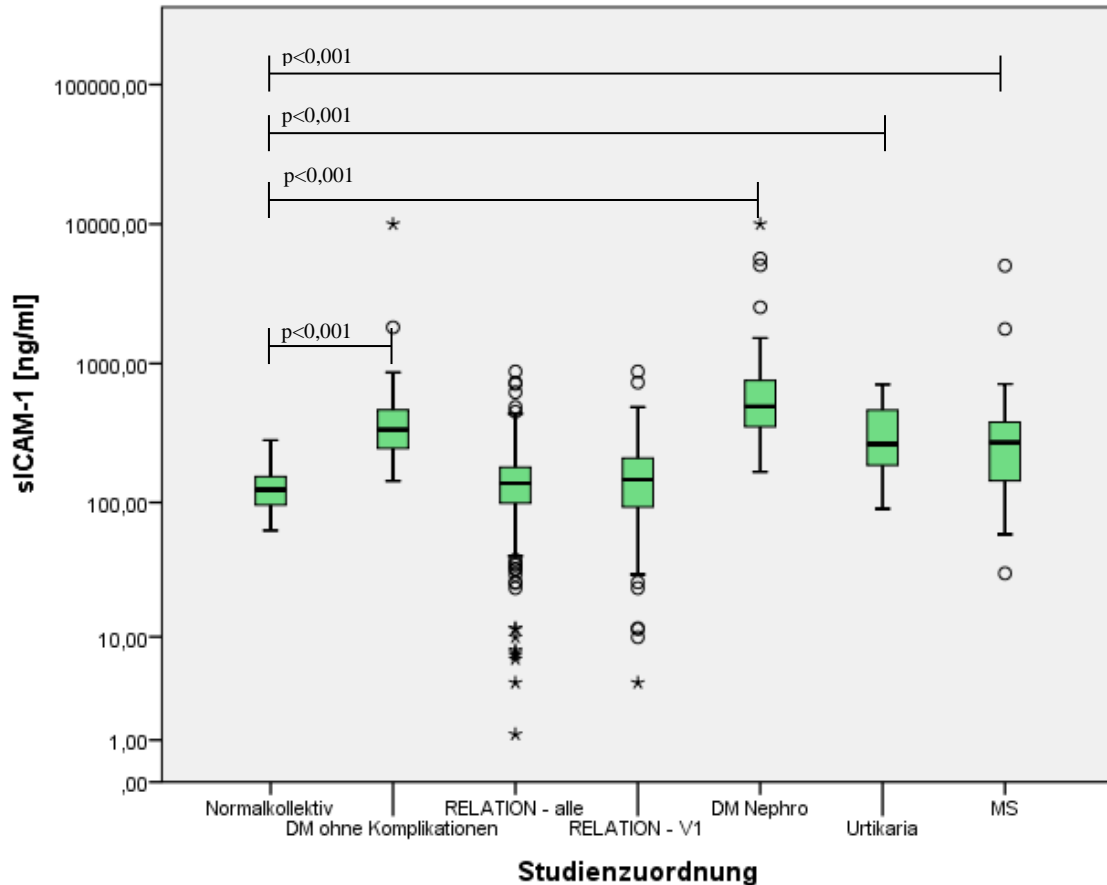
### 3.3.13 sICAM-1

Einen Überblick zur Verteilung der sICAM-1 Werte über die Studiengruppen erhält man in Tabelle 77.

sICAM-1 [ng/ml]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	Relation (DMö Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=41)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	134,89	730,35	156,94	173,37	1072,78	327,76	410,95	
<b>Median</b>	123,91	335,07	137,45	146,40	492,74	264,07	271,39	
<b>Standardabweichung</b>	57,20	1779,76	108,61	134,27	1819,55	178,93	719,40	
<b>Varianz</b>	3271,71	3167554,24	11796,64	18029,63	3310779,20	32014,32	517538,14	
<b>Minimum</b>	62,69	143,09	1,20	4,15	166,58	90,01	30,34	
<b>Maximum</b>	281,33	10000,00	876,18	876,18	10000,00	705,82	5027,02	
<b>Perzentile</b>	25	95,25	237,33	98,74	92,58	342,88	184,32	142,17
	50	123,91	335,07	137,45	146,40	492,74	264,07	271,39
	75	156,20	478,11	180,07	210,41	802,66	476,84	380,14

Tabelle 77: sICAM-1 Konzentrationen in [ng/ml] der verschiedenen Gruppen

Im Gegensatz zum Adhäsionsmolekül sVCAM-1 unterscheiden sich nicht alle sICAM-1 Konzentrationen der Krankheitsgruppen von der Serumkonzentration gesunder Probanden (Abbildung 83). Bei Patienten mit frühem Diabetes, Patienten mit Nephropathie, Urtikaria- und MS-Patienten liegen signifikant höhere sICAM-Konzentrationen vor, als bei gesunden Probanden ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben mit Bonferroni Anpassung). Die DMÖ-Patienten weisen keine signifikant verschiedenen Konzentrationen verglichen mit den Probanden des Normalkollektivs auf.



**Abbildung 83: Vergleich der sICAM-1 Konzentrationen [ $\mu\text{g/ml}$ ] zwischen den Kollektiven. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.**

Vergleicht man die Diabetesgruppen miteinander lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen (Abbildung 84). Die DMÖ Patienten haben signifikant niedrigere Konzentrationen als frühe Diabetiker und Diabetiker der Nephropathie ( $p < 0,001$ ). Die Patienten mit Nierenbeteiligung weisen außerdem eine signifikant höhere sICAM-Serumkonzentration als frühe Diabetiker auf ( $p = 0,005$ ).

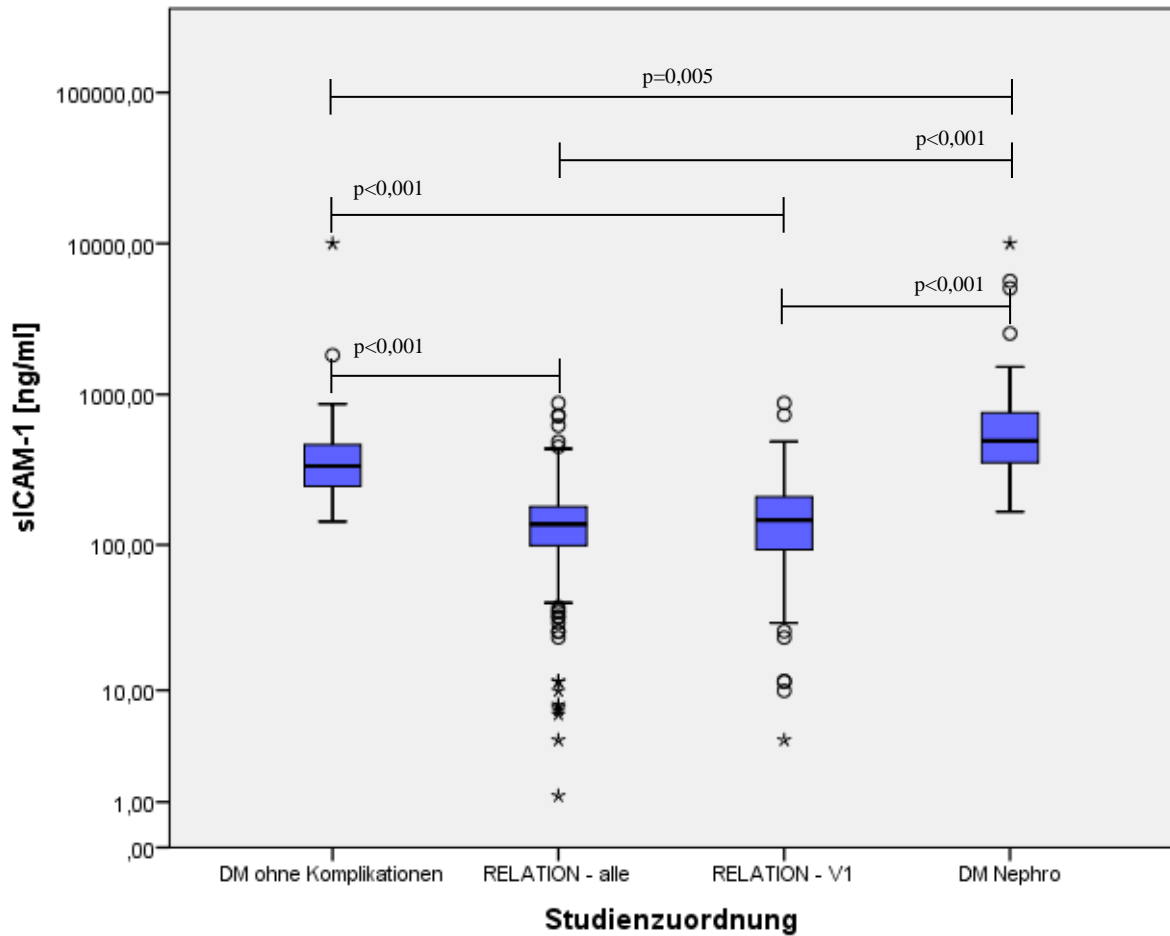


Abbildung 84: Vergleich der sICAM-1 Konzentrationen [ng/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.

### 3.3.14 IL-6

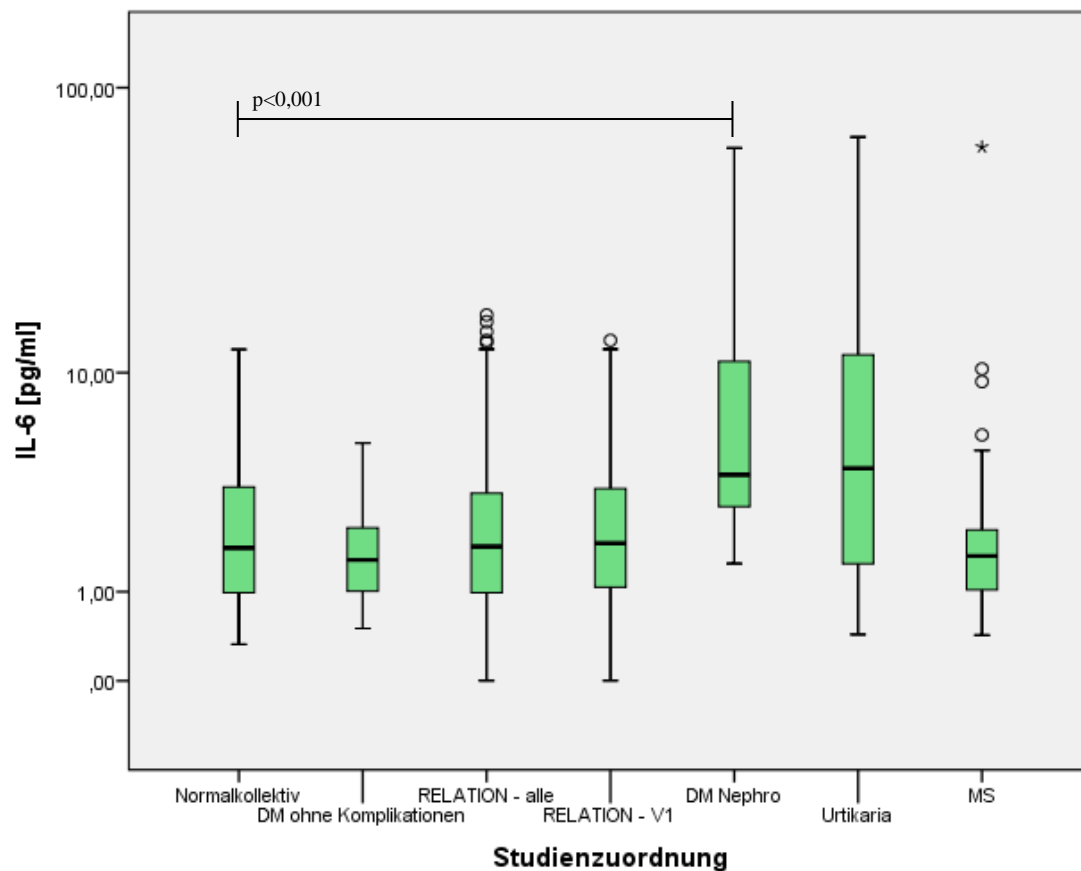
In Tabelle 78 werden die IL-6-Konzentrationen mit dazugehörigem Mittelwert, Median etc. verteilt über die Studienpopulationen gelistet.

IL-6 [pg/ml]	Normal-kollektiv (n=32)	DM ohne Komplikationen & Prädiabetiker (n=30)	RELATION (DMÖ Patienten) (n=291)	Relation (DMö Patienten Visite 1) (n=114)	Diabetiker m. Nephro (n=42)	Urtikaria Patienten (n=40)	Multiple Sklerose Patienten (n=50)	
<b>Mittelwert</b>	2,73	1,81	2,59	2,63	9,29	11,41	3,28	
<b>Median</b>	1,81	1,56	1,84	1,92	3,97	4,23	1,64	
<b>Standardabweichung</b>	2,61	1,05	2,54	2,37	12,28	17,66	8,79	
<b>Varianz</b>	6,83	1,10	6,43	5,62	150,75	311,92	77,31	
<b>Minimum</b>	0,33	0,50	0,00	0,00	1,49	0,44	0,43	
<b>Maximum</b>	12,18	5,35	16,23	13,15	62,24	67,83	62,70	
<b>Perzentile</b>	25	0,98	1,00	0,97	1,07	2,87	1,47	1,01
	50	1,81	1,56	1,84	1,92	3,97	4,23	1,64
	75	3,55	2,34	3,32	3,48	11,34	12,05	2,25

Tabelle 78: IL-6 Konzentrationen in [pg/ml] der verschiedenen Gruppen

Lediglich Diabetiker mit Nephropathie weisen eine signifikant höhere Konzentration von IL-6 im Serum auf im Vergleich zu gesunde Probanden (Abbildung 85). Ein Trend zu höheren

Konzentrationen zeigt sich auch bei Urtikaria-Patienten. Durch die Bonferroni-Anpassung ist aber der zugehörige p-Wert von 0,011 nicht mehr signifikant. Ein p-Wert von  $\leq 0,008$  wäre dazu nötig gewesen (Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben mit Bonferroni-Anpassung).



**Abbildung 85: Vergleich der IL-6 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Kollektiven in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.**

Deutliche Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der Diabetesgruppen untereinander (Abbildung 86). Patienten mit Nephropathie haben eine signifikant höhere IL-6 Serumkonzentration als Patienten mit diabetischem Makulaödem und frühe Diabetiker ( $p < 0,001$  oder  $p = 0,001$ ). Keinen Unterschied gibt es zwischen DMÖ Patienten und den frühen Diabetikern.

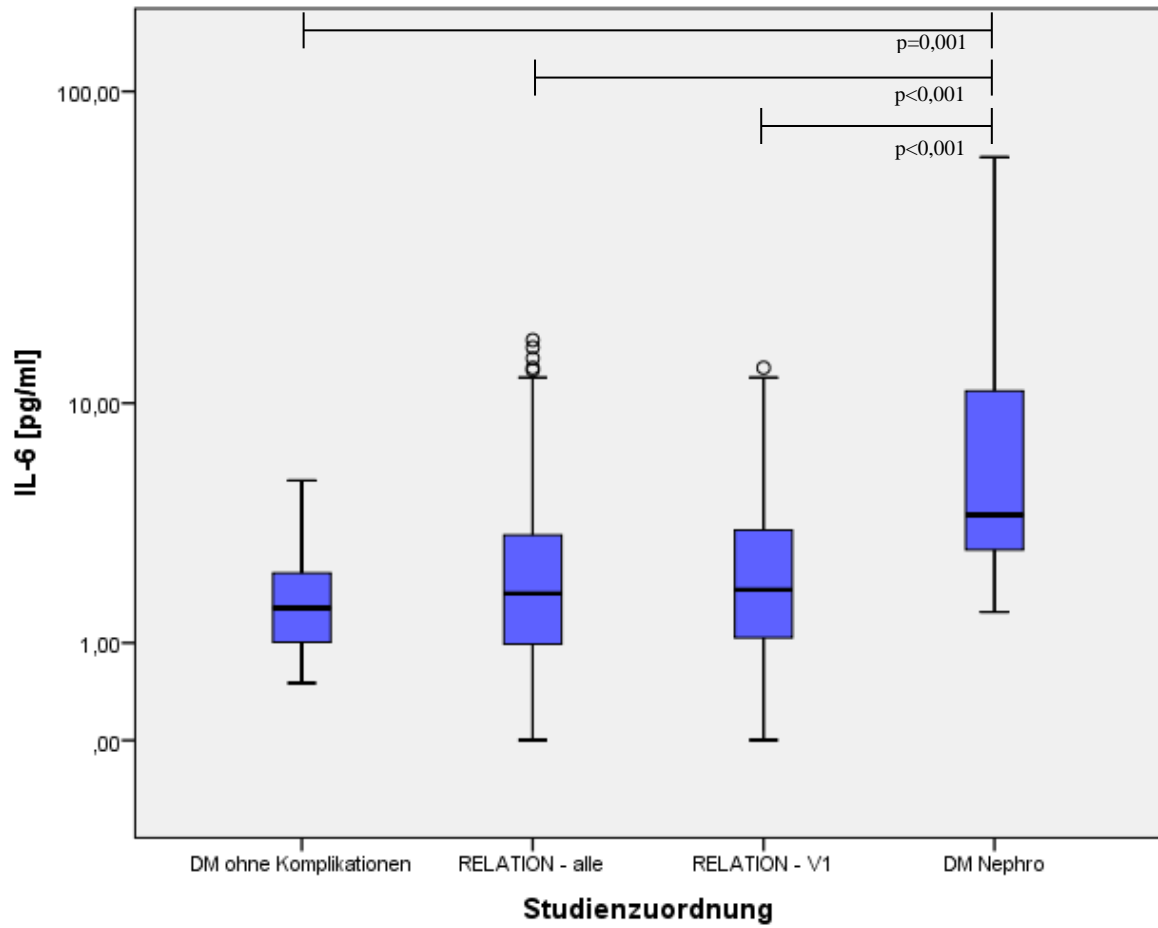


Abbildung 86: Vergleich der IL-6 Konzentrationen [pg/ml] zwischen den Diabetesgruppen in logarithmischer Auftragung. Kreise und Sterne markieren Ausreißer.



### 3.3.15 Zusammenfassung der Kollektivvergleiche

Die zuvor in Boxplots aufgetragenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Probandengruppen sind in Tabelle 79 und Tabelle 80 noch einmal zusammengefasst.

Signifikante Werte gegenüber gesunden Personen (n=32)						
	DM o. Komplikationen (n=30)	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)	DM Nephrologie (n=42)	Urtikaria (n=40)	MS (n=50)
IL-8	↑	↑	↑	↑	↑	↑
IL-10	↑	↑	↑	↑		↑
IL-17	k.A.	↓	↓	↓		↑
MCP-1	↑	↑	↑	↑	↑	
VEGF	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Apo-A1	↓			↓		↓
Apo-A2	↓			↓		↓
Apo-B	↓			↓		↓
Apo-CII						↓
Apo-CIII				↑		↓
Apo-E						↓
sVCAM-1	↑	↑	↑	↑	↑	↑
sICAM-1	↑			↑	↑	↑
IL-6				↑		

Tabelle 79: Übersicht signifikant Unterschiedlicher Biomarkerwerte im Vergleich zum Normalkollektiv mit ↑ für höhere Konzentration als Normalkollektiv und ↓ für niedrigere Konzentration als Normalkollektiv

Es gibt immer wenigstens ein Krankheitskollektiv, deren Zytokin- und Adhäsionsmolekülkonzentrationen sich von der Serumkonzentration gesunder Probanden unterscheiden. Die IL-8-, VEGF- und sVCAM-1-Serumkonzentrationen sind bei allen sechs betrachteten Krankheitsgruppen gegenüber Gesunden erhöht. Meist sind die Zytokinkonzentrationen höher bei den erkrankten Patienten verglichen mit den gesunden Probanden, nur IL-17A bildet eine Ausnahme, da die Serumkonzentrationen bei den DMÖ-Patienten und den Diabetikern der Nephrologie im Vergleich zu gesunden Patienten verringert sind. Wenn die Apolipoproteinkonzentrationen signifikant verändert sind, dann ist die Konzentration bei den Krankheitskollektiven im Vergleich zu den gesunden Probanden verringert. Lediglich die Apo-CIII Konzentration ist bei den Diabetikern mit Nierenbeteiligung signifikant höher, als bei Gesunden.

Auffällig ist außerdem das Profil der MS-Patienten. Bis auf MCP-1 und IL-6 sind die Konzentrationen der Zytokine und Adhäsionsmoleküle signifikant höher als bei gesunden Probanden. Die Apolipoproteine weisen durchgehend eine niedrigere Konzentration bei MS-Patienten auf, als bei gesunden Probanden.

In Tabelle 80 sind die signifikanten Ergebnisse der Vergleiche zwischen Diabetikergruppen zusammengefasst. Auf der linken Seite der Tabelle sind die signifikanten Unterschiede der Serumkonzentrationen im Vergleich zu den frühen Diabetikern aufgetragen. Auf der rechten Seite der Tabelle werden die signifikanten Konzentrationsunterschiede im Vergleich zu den Diabetikern mit Nierenbeteiligung dargestellt. Die Zytokinkonzentrationen sind, wenn signifikant, dann signifikant niedriger als die Konzentration bei den Diabetikern ohne Komplikationen bzw. den Nephropathiepatienten. Bei den Apolipoproteinen zeigen sich nur wenige Unterschiede. Liegt ein

Unterschied vor, dann ist aber die Konzentration im Vergleich zu Patienten mit frühem Diabetes signifikant erhöht. Die DMÖ Patienten weisen signifikant niedrigere Konzentrationen bei den Adhäsionsmolekülen auf als frühe Diabetiker. Die Konzentration der Adhäsionsmoleküle ist bei den Nephropathie-Patienten gegenüber den DMÖ Patienten signifikant erhöht. Im Vergleich zu den Nephropathiepatienten sind die Zytokinwerte der DMÖ Patienten signifikant niedriger, außer bei IL-17A. Bei den IL-17A Konzentrationen zeigt sich kein signifikanter Unterschied, wenn man nur die Baselinewerte der RELATION Patienten betrachtet. Bei den Apolipoproteinen haben die DMÖ Patienten vermehrt signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Patienten mit Nierenbeteiligung (Apo-A1, Apo-A2, Apo-B). Nur die Apo-CIII-Werte sind bei den DMÖ Patienten niedriger, zieht man alle Abnahme-Zeitpunkte in Betracht. Die Konzentration der Adhäsionsmoleküle bei den DMÖ-Patienten liegt signifikant unter dem Konzentrationsniveau der Nephropathie-Patienten.

	Signifikante Werte gegenüber frühen Diabetikern (n=30)			Signifikante Werte gegenüber Diabetikern der Nephrologie (n=42)	
	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)	DM Nephrologie (n=42)	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)
IL-8	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10	↓	↓	↓	↓	↓
IL17	k. A.	k. A.	k. A.	↓	
MCP-1	↓	↓		↓	↓
VEGF	↓	↓		↓	↓
Apo-A1				↑	
Apo-A2	↑			↑	↑
Apo-B	↑	↑		↑	↑
Apo-CII			↑		
Apo-CIII			↑	↓	
Apo-E					
sVCAM-1	↓	↓	↑	↓	↓
sICAM-1	↓	↓	↑	↓	↓
IL-6			↑	↓	↓

**Tabelle 80: Übersicht signifikant unterschiedlicher Biomarkerwerte im Vergleich zu frühen Diabetikern (linke Hälfte der Tabelle) bzw. Diabetikern mit Nephropathie (rechte Hälfte der Tabelle) mit ↑ für signifikant höhere Konzentrationen und ↓ für niedrigere Konzentrationen im Vergleich zu frühen Diabetikern (links) bzw. Diabetikern mit Nephropathie (rechts).**

## 4 Diskussion

Am Anfang des Kapitels werden die klinischen Ergebnisse der RELATION-Studie diskutiert, gefolgt von der Interpretation der Biomarkermessungen der RELATION Studie und der Diskussion der Ergebnisse der verschiedenen Kollektive.

### 4.1 Klinische Ergebnisse der RELATION Studie

In der Phase IIIB/IV RELATION Studie wurde untersucht, ob die Kombination von Ranibizumab mit Laserphotokoagulation der alleinigen Lasertherapie überlegen ist in Bezug auf bestkorrigierten Visus nach 12 Monaten Behandlungsdauer. Die Ergebnisse der RELATION Studie bestätigen die Überlegenheit der Kombi-Therapie, obwohl die Studie vorzeitig beendet wurde. Dies geschah auf Grund der Erteilung der Zulassung von Ranibizumab zur Behandlung einer Visusbeeinträchtigung eines Diabetischen Makulaödems. Schon ab der ersten Injektion zeigen sich signifikant höhere Visuswerte in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Lasergruppe, was sich bis Monat 12 fortsetzt (6,37 ETDRS Buchstaben  $\pm$  8,780 vs. 2,03 ETDRS Buchstaben  $\pm$  7,596). Wie bei vorzeitig abgebrochenen klinischen Prüfungen üblich wurden auch bei der RELATION Studie die letzten gemessenen Werte für alle Folgemonate übernommen, was als LOCF (*last observation carried forward*) Methode bezeichnet wird (siehe Kapitel 3.1.3). Die Visusentwicklung scheint von der zielgerichteten Wirkung des Ranibizumabs rasch zu profitieren. Schon einen Monat nach der ersten Injektion gewinnen die Patienten im Kombinationsarm fast 4 Buchstaben im Vergleich zu Baseline, wohingegen der sich der Visusanstieg auf durchschnittlich 2 Buchstaben im Laserarm erst an Monat 5 einstellt und dann stabil bleibt ( $p=0,005$ ).

Bei den weiteren Auswertungen zu relevanten Visusendpunkten sind Tendenzen zu Gunsten der Kombinationstherapie erkennbar, aber nicht signifikant (Anteil der Patienten mit einer Visuszunahme (76 % vs. 42 %), mit einem Visus besser als 73 Buchstaben (41 % vs. 29 %) und mit einem Buchstabengewinn von mehr als 15 Buchstaben (15,8 % vs. 5,3 %)). Beide Therapien waren gleich effektiv wenn es darum ging einen Verlust von mehr als 15 Buchstaben zu verhindern (1,3 % vs. 2,6 %). Betrachtet man noch weitere Kategorien der Visusgewinner (Gewinn von mehr als 5, 10 Buchstaben) oder Verlierer (jeglicher Verlust, Verlust von mehr als 5 oder 10 Buchstaben), ist eine deutliche Tendenz zu Gunsten der Kombination erkennbar. Nur in der Kategorie *Anteil an Patienten mit einem Gewinn von mehr als zehn Buchstaben*, konnte ein signifikanter Vorteil für die Kombinationsgruppe erreicht werden. Gründe, warum nur wenige Signifikanzen vorhanden sind, sind zum einen die geringe Fallzahl und zum anderen der frühe Studienabbruch. Darüber hinaus hatten 18 von 114 Patienten (16 %) die Initialphase mit 4 aufeinanderfolgenden, monatlichen Injektionen nicht abgeschlossen.

In der Phase-III Zulassungsstudie RESTORE Studie zeigt sich nach einem Jahr Beobachtungszeitraum ein signifikanter Unterschied beider Ranibizumab-Gruppen (Ranibizumab + Scheinlaser, Ranibizumab + Laser) im Vergleich zur Lasergruppe zu Gunsten der Ranibizumab-Gruppen bezüglich Visusgewinn und Reduktion der Retinadicke (siehe Tabelle 81 und Tabelle 82) [44]. In der RELATION-Studie waren wie in der RESTORE 300 DMÖ Patienten geplant [44]. Ein- und Ausschlusskriterien waren bewusst ähnlich gewählt um die Studien einfacher vergleichen zu können. Die RELATION Studie beginnt mit einer viermonatigen statt einer dreimonatigen Initialphase und berücksichtigte neben Visuskriterien zusätzlich noch OCT-basierte Wiederbehandlungskriterien.

In der RELATION Studie zeigt sich eine deutliche Abnahme der Retinadicke (105  $\mu$ m ab Baseline im Kombinationsarm und 79  $\mu$ m im Laserarm). Diese Änderung der Retinadicke bezogen auf Baseline ist

ab Visite drei signifikant größer in der Kombigruppe, aber ab Visite neun nur mehr tendenziell feststellbar. Auch hier spielt womöglich der Effekt des frühen Studienabbruchs bei geringer Patientenzahl eine Rolle, denn numerisch ist die Kombinationsgruppe an jeder Visite überlegen. Sehr interessant ist, dass die Retinadicke in der Lasergruppe über die Zeit kontinuierlich abnimmt. Der Visus hingegen folgt diesem Trend nicht, sondern stabilisiert sich in der Lasergruppe ab Monat 5.

Auch wenn die RELATION nach durchschnittlich sechs Monaten beendet wurde, wurden ähnliche Reduktionen der Retinadicke erreicht wie in der Zulassungsstudie RESTORE. In der RESTORE nahm die Retina in den Ranibizumab-Armen im Mittel um 119  $\mu\text{m}$  und 128  $\mu\text{m}$ , im Laserarm um 61  $\mu\text{m}$  ab ( $p < 0,001$ ).

Bezüglich Injektionshäufigkeit in der RELATION Studie wurde die Fragestellung untersucht, ob in der Lasergruppe mehr Scheininjektionen nötig sind als in der Kombinationsgruppe, da ein stärkerer Therapieeffekt in der Kombigruppe angenommen wurde. Den fehlenden Unterschied kann man aber mit der Visitenzahl erklären. Im Mittel fanden acht Visiten statt, was einer Behandlungsdauer von sechs Monaten entspricht. In den ersten vier Monaten waren Pflichtinjektionen gefordert, so dass durchschnittlich nur für zwei Monate ein Unterschied zwischen Laser und Kombigruppe bestehen konnte. Da es durchaus Patienten gibt, die auch nach vier Injektionen in der Kombigruppe noch weitere Behandlungen benötigen und die Studie relativ früh beendet wurde, unterscheidet sich die Injektionszahl nicht signifikant (durchschnittlich 5,38 im Kombiarm bzw. 5,58 im Laserarm).

Die Studienpatienten wurden in der RELATION im Mittel sechs Monate beobachtet. In den Publikationen der RESTORE Studie und der DRCR.net Protocol I Studie [45], bei der auch bedarfsorientierte Behandlungsregime von Ranibizumab mit unterschiedlichem Beginn der Laserbehandlung gegen Laser verglichen wurde, kann man aus den Visuskurven die Ergebnisse für den 6-Monats Zeitpunkt herauslesen. In der DRCR.net Protocol I Studie liegen die Patienten in den Ranibizumab-Armen bei einem Buchstabengewinn von 7, im Laserarm bei 2 ETDRS Buchstaben. In der RESTORE-Studie liegt nach 6 Monaten Behandlung in den Ranibizumab-Gruppen ebenfalls ein Buchstabengewinn von 6 vor im Gegensatz zu nur etwa einem Buchstaben im Laserarm. Die Visusergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der RELATION Studie. In der DRCR.net Protocol I Studie gewannen die Patienten nach Monat 6 noch 1-2 Buchstaben in den Ranibizumab-Armen und 1 Buchstabe in der Lasergruppe hinzu. Möglicherweise hätten die RELATION Patienten noch weitere Buchstaben hinzugewonnen, wäre die Studie nicht abgebrochen worden.

In den früheren Studien zeigt sich kein Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten. In Tabelle 81 sind die Mittelwerte des Visusgewinns von Baseline zum primären Endpunkt nach 1 Jahr der Ranibizumabgruppen der DRCR.net Protocol I, der RESTORE und der RELATION Studie aufgetragen, jeweils mit dem Anteil der Patienten, die vor Randomisierung schon gelasert waren [45]. In der RELATION Studie waren mehr mit Laser vorbehandelt als in anderen publizierten Studien. Schon ab Visite 4 zeigt sich in der Kombigruppe ein signifikanter Unterschied zwischen Laser vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten ( $5 \pm 9$  vs.  $10 \pm 6$ , bei 71 %). Womöglich gibt das den Ausschlag zu einem signifikanten Unterschied zwischen den vorgelaserten und den Laser naiven Patienten im Visusgewinn. Auch in der RESTORE Studie zeigt sich eine leichte Tendenz, dass vorbehandelte Patienten ein schlechteres Visusergebnis mit der kombinierten Therapie haben.

	DRCR.net Protocol I				RESTORE				RELATION	
Behandlung	Ranibizumab + prompt Laser (n=187)		Ranibizumab + deferred Laser (n=188)		Ranibizumab Mono (n=116)		Ranibizumab + prompt Laser (n=118)		Kombinationsarm (n=76)	
Vorgelasert	Ja (54%)	Nein (46%)	Ja (54%)	Nein (46%)	Ja (52%)	Nein (47%)	Ja (42%)	Nein (53%)	Ja (71%)	Nein (29%)
Visusgewinn nach einem Jahr Behandlung (Mittelwert, ETDRS Buchstaben)	9	9	8	11	6	6	5	7	5	10*

**Tabelle 81: Unterschiede des Visusgewinn nach einem Jahr Behandlung in den Subgruppen vorbehandelte/nicht vorbehandelte Patienten der DRCR.net Protocol I, RESTORE und RELATION Studie in den Ranibizumab Armen. Nur in der RELATION Studie war der Unterschied signifikant. In allen Studien wurde der primäre Endpunkt 52 Wochen nach Baseline erhoben.**

In Tabelle 82 folgt der Vergleich der Ranibizumab-Studien mit den anderen Substanzen und Ranibizumab-Studien mit unterschiedlichsten Behandlungsregimen, die für die Behandlung des DMÖ publiziert wurden. Große Unterschiede liegen beim Baselinevisus, dem Beobachtungszeitraum und den Wiederbehandlungsschemata vor, was es schwierig macht die Ergebnisse zu vergleichen. Die Änderung des Visus gegenüber Baseline beträgt in den DMÖ Studien zwischen 4 und 12 Buchstaben beim primären Endpunkt, der zwischen 6 und 24 Monate Beobachtungszeitraum liegt. Aber ein vermeintlich großer Visusgewinn kommt womöglich durch schlechtere Ausgangswerte zu Stande. Behandlungsregimen, bei denen häufigere Injektionen vorgeschrieben werden, könnten womöglich auch einen höheren Visus erzielen. Dementsprechend sind auch die Anteile der Patienten, die 15 Buchstaben und mehr gewinnen sehr unterschiedlich in den Studien (zwischen 12 und 45 %). Auch die Retinadicken werden effektiv gesenkt, wobei man hier auch die Ausgangslage beachten muss: Liegt bei Baseline eine stark verdickte Retina vor, fällt die Senkung auch deutlicher aus.

Seit kurzem liegen die ersten Ergebnisse einer Head-to-Head Studie des DRCR.net (Protocol T) vor, die 660 Patienten mit DMÖ untersuchte, welche entweder 2,0 mg Aflibercept (n=224), 1,25 mg Bevacizumab (n=218) oder 0,3 mg Ranibizumab (n=218) in einem Bedarfsschema erhalten haben [53]. Der Visusgewinn nach einem Jahr betrug 13,3 Buchstaben in der Aflibercept-, 9,7 in der Bevacizumab- und 11,2 in der Ranibizumab-Gruppe ( $p < 0,001$  Aflibercept vs. Bevacizumab,  $p = 0,03$  Aflibercept vs. Ranibizumab). Der Unterschied im Visusgewinn wurde von den Autoren als nicht klinisch relevant eingestuft. Interessant sind die Ergebnisse der Patientensubgruppe, die mit einem Ausgangsvisus von unter 69 Buchstaben in die Studie randomisiert wurden. Bei dieser Subgruppe ist 2,0 mg Aflibercept sowohl 1,25 mg Bevacizumab als auch 0,3 mg Ranibizumab bezüglich Visusgewinn ab Baseline signifikant überlegen (18,9 Buchstaben mit Aflibercept, 11,8 Buchstaben mit Bevacizumab, 14,2 Buchstaben mit Ranibizumab;  $p < 0,001$  Aflibercept vs. Bevacizumab,  $p = 0,003$  Aflibercept vs. Ranibizumab und  $p = 0,21$  Ranibizumab vs. Bevacizumab). Bei Patienten mit einem Baselinevisus über 69 Buchstaben zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied im Visusgewinn zwischen den drei Substanzen (8,0 Buchstaben mit Aflibercept, 7,5 mit Bevacizumab und 8,3 mit Ranibizumab). In der Subgruppe mit niedrigem Eingangsvisus wurden auch Unterschiede im morphologischem Outcome und dem Laserbedarf berichtet. Jedoch gibt es keine Differenzen in der Injektionshäufigkeit zwischen den Substanzen. Die Autoren führen die Unterschiede bei der Wirksamkeit der Substanzen auf Struktur, Spezifität und Bindungsaffinität zurück, die aber noch nicht in Gänze verstanden sind und deren Auswirkungen auf die Effektivität der Substanzen nicht belegt sind. Eine wichtige Einschränkung in der Interpretation der Ergebnisse wurde von den Autoren nicht diskutiert. Ranibizumab wird in der Protocol T Studie mit der Dosierung 0,3 mg eingesetzt, die in den USA für den monatlichen Gebrauch zugelassen ist. Es gibt aber Hinweise, dass die 0,3 mg Dosis der

0,5 mg Dosis unterlegen ist [49, 171-173]. Daher gilt es die Effektivität der in Europa üblichen 0,5 mg Ranibizumab im PRN Schema mit 2,0 mg Aflibercept PRN Schema zu untersuchen, um eine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen geben zu können.

Klinische Prüfung	FAME [56-58]	Bolt [50, 52]	DaVinci [51, 54]	RIDE/RISE [49, 174]	DRCR.net Protocol I [31, 45, 47]	RESTORE [44, 48, 175]	RELATION
<b>Wirkstoff (Patientenzahl)</b>	Fluocinolon 0,2 bzw. 0,5 µg / Tag als Insert (n=375/393)	Bevacizumab 125 mg (n=42)	Aflibercept 0,5 oder 2 mg: 0,5q4 [175] (n=44) / 2q4 (n=44) / 2q8 (n=42) / 2 PRN (n=45)	Ranibizumab RISE 0,3/0,5 mg (n=125/125) RIDE: 0,3/0,5 mg (n=125/127)	Ranibizumab 0,5 mg sofortiger Laser (n= 293/ verzögerter Laser (n=187)	Ranibizumab 0,5 mg (n=116)/ 0,5 mg + Laser (n= 118)	Ranibizumab 0,5mg + Laser (n=76)
<b>Ausgangsvisus [ETDRS Buchstaben]</b>	53,3 / 52,9	55,7	59,3 / 59,9 / 58,8 / 59,6	RISE: 54,7/56,9 RIDE: 57,5/56,9	65 / 66	64,8/ 63,4	61,41
<b>Retinadicke Baseline [µm]</b>	460,8 / 485,1	507	426,1 /456,6/ 434,8/ 426,6	RISE: 474,5/463,8 RIDE: 482,6/463,8	407 / 371	426,6 / 416,4	442,7
<b>HbA1c [%]</b>	7,6 / 7,4	7,6	8,10 / 8,08 / 7,85 / 7,97	RISE: 7,7 / 7,7 RIDE: 7,6 / 7,6	7,3 / 7,3	7,3 / 7,9	7,5
<b>DMÖ Diagnose seit [Jahre]</b>	3,6 / 3,5	2	k.A.	RISE: 2,1 / 2,1 RIDE: 1,6 / 1,9	k.A.	1,7 / 2,1	1,6
<b>Behandlungsalgorithmus</b>	1 Injektion des nicht bioabbaubaren Steroid Implantats bei Baseline, Wiederbehandlung nach 12 Monaten möglich	3 Injektionen 6 wöchentlich ab Baseline, OCT basierte Wiederbehandlung bis Stabilität (keine Veränderung der CRT → Dicke stabil innerhalb 20 µm)	0,5mg 4-wöchentlich (0,5q4); 2mg 4-wöchentlich (2q4); 2mg 3-monatlich dann alle 2 Monate (2q8); 2mg 3monatlich dann bei Bedarf (2 PRN) Behandlung bei: <ul style="list-style-type: none"> <li>• CRT ≥250 µm</li> <li>• Zunahme um ≥50 µm CRT im Vergleich zum niedrigsten Wert</li> <li>• Verlust von ≥ 5 Buchstaben im Vergleich zur letzten Messung inkl. CRT Zunahme</li> <li>• oder Zunahme von ≥5 Buchstaben zwischen dieser und der vorherigen Visite</li> </ul>	Monatliche Injektionen; Laser: ab Monat 3 möglich, wenn <ul style="list-style-type: none"> <li>• Retinadicke ≥ 250 µm mit einer Änderung von ≥ 50 µm im Vergleich zum Vormonat (Keine Laser Vorbehandlung in letzten 3 Monaten)</li> </ul>	4 initiale monatliche Injektionen Behandlung bis <i>Erfolg</i> <i>Erfolg:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• BCVA 84 Buchstaben</li> <li>• CSFT ≤ 250 µm</li> </ul> <i>Bei Verbesserung (vgl. mit Vormonat) → weitere Inj. wird gegen:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• VA-Zunahme um 5 Buchstaben</li> <li>• Abnahme der Retinadicke um 10 %</li> </ul> <i>Keine Verbesserung (vgl. mit Vormonat) → Prüfarzt entscheidet, ob behandelt wird:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zunahme &lt; 5 Buchstaben oder Verschlechterung</li> <li>• CRT Abnahme weniger als 10 % oder Zunahme CRT</li> </ul> <i>Misserfolg (dann Behandlung nach Einschätzung des Arztes:</i>	Monatliche Injektionen bis stabiler Visus an 2 aufeinanderfolgenden Visiten erreicht ist (=Stabilität): <ul style="list-style-type: none"> <li>• keine VA Verbesserung</li> <li>• Visus besser als 84 Buchstaben</li> <li>• Wiederaufnahme bei Bedarf (PRN)</li> <li>• bei Visusverlust auf Grund DMÖ Progression behandeln bis Stabilität erneut erreicht wird;</li> </ul>	4 monatliche initiale Injektionen & Laser bei Baseline, danach Wiederbehandlung bei Bedarf, wenn: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Visusverschlechterung wegen DMÖ auftrat</li> <li>• Zunahme der zentralen Retinadicke um 20 % oder</li> <li>• zentrale Retinadicke ≥ 250 µm außer der Prüfarzt ist der Ansicht, dass eine weitere Therapie keinen Nutzen hat</li> </ul>

Klinische Prüfung	FAME [56-58]	Bolt [50, 52]	DaVinci [51, 54]	RIDE/RISE [49, 174]	DRCR.net Protocol I [31, 45, 47]	RESTORE [44, 48, 175]	RELATION
					<ul style="list-style-type: none"> <li>• VA 10 oder mehr Buchstaben schlechter als Baseline</li> <li>• DME <math>\geq</math> 250<math>\mu</math>m</li> <li>• vollständiger Laser gegeben aber keine Verbesserung</li> </ul>		
Laser erlaubt?	Ja, als Rescue ab Woche 6	k.A.	k.A.	Ja (s.o.)	Ja /ab Woche 16	Nein (=Scheinlaser) / ja	ja
Beobachtungszeitraum (prim. EP) [Monate]	24	12	6	24	12	12	6,4
Anzahl Behandlungen prim. EP mit Studienmedikation	0,2 $\mu$ g / 0,5 $\mu$ g Patientenanteil [%]: 1: 76,5 / 74,6* 2: 21,3 / 22,6 3: 1,9 / 2,5 4: 0,3 / 0,3	9 Injektionen (Median)	5,6 / 5,5 / 3,8 / 4,4 (Mittelwert)	RISE: 21,5 / 20,9 RIDE: 20,5 / 21,9 (Mittelwert)	8/9 (Median)	7 / 6,8 (Mittelwert)	5,4 (Mittelwert)
Anzahl Laserbehandlungen	36,7 % / 35,2 % der Patienten	k.A.	k.A. (12 Monate: 0,8 / 0,5 / 0,8 / 0,7) (Mittelwert)	RISE: 0,8 / 0,8 RIDE: 0,7 / 0,3 (Mittelwert)	Behandlung: (n:%/%) keine: 0/70; 1:31/20; 2: 32/10; 3:27/11; 4:11/0 (Median)	2,0 (Scheinlaser) / 1,8 (Mittelwert)	1,4 (Mittelwert)
Behandlungen DMÖ außerhalb Prüfplans	12,5 / 13,9 %	k.A.	k.A.	k.A.	n=1 (Triamcinolon) / 0	k.A.	keine
Visusgewinn ggü. Baseline (prim. EP, LOCF)	4,4 / 5,4 (Mittelwert)	8 (Median)	8,6 / 11,4 / 8,5 / 10,3 (Mittelwert)	RISE: 12,5 / 11,9 RIDE: 10,9 / 12,0 (Mittelwert)	9 / 9 (Mittelwert)	6,8 / 6,4 (Mittelwert)	6,4 (Mittelwert)
Anteil Pat. $\geq$ 15 Buchstaben Gewinn [%] ggü. Baseline	28,7 / 28,6	11,9	34 / 32 / 17 / 27	RISE: 44,8 / 39,2 RIDE: 33,6 / 45,7	30 / 28	22,6 / 22,6	15,8
Reduktion Retinadicke ggü. Baseline [ $\mu$ m]	168 / 177** (Mittelwert)	130 (Mittelwert)	144,6 / 194,5 / 127,3 / 153,3 (Mittelwert)	RISE: 250,6/253,1 RIDE: 259,8/270,7 (Mittelwert)	131/137 (Mittelwert)	119 / 128 (Mittelwert)	105 (Mittelwert)
Visusgewinn Nachbeobachtung ggü. Baseline	5,3 (Mittelwert; gepoolt beide Arme LOCF; 36 Monate)	8,6 (Mittelwert; 24 Monate)	9,7 bis 13,4 (keine genaueren Angaben im Paper; 12 Monate)	RISE: 14,2 / 11,0 RIDE: 10,6 / 11,4 (36 Monate) (Mittelwert)	7/10 (36 Monate; Mittelwert)	8,0 / 6,7 (36 Monate; Mittelwert; n=83/83 )	-



Klinische Prüfung	FAME [56-58]	Bolt [50, 52]	DaVinci [51, 54]	RIDE/RISE [49, 174]	DRCR.net Protocol I [31, 45, 47]	RESTORE [44, 48, 175]	RELATION
(Zeitraum)							
Anteil Pat. $\geq$ 15 Buchstaben Gewinn [%] ggü. Baseline (Zeitraum)	28,7 / 27,8 (36 Monate)	32 (24 Monate)	Zwischen in etwa 20-42 % (keine genauen Angaben im Paper; 12 Monate)	RISE: 51,2 / 41,6 RIDE: 36,8 / 40,2 (36 Monate)	26 / 32 (36 Monate)***	27,7 / 30,1	-
Reduktion der Retinadicke ggü. Baseline [ $\mu$ m] (Zeitraum)	181 / 185** (36 Monate, Mittelwert)	146 (24 Monate; Mittelwert)	Zwischen etwa 150 und 225 $\mu$ m (keine genauen Angaben im Paper; 12 Monate)	RISE: 261,2/269,1 RIDE: 261,8/266,7 (36 Monate) (Mittelwert)	152/174 (36 Monate; Mittelwert)	142 / 146 (36 Monate, Mittelwert)	-

Tabelle 82: Übersicht der Baselinewerte und Ergebnisse der wichtigsten DMÖ-Studien; \*in der Publikation der 24 Monatsdaten von Campochiaro [57] ist die Anzahl der Patienten mit 1 Injektion nicht angegeben. Dieser Wert wurde berechnet (von 100 % wurde der Anteil der Patienten mit 2, 3 oder 4 Injektionen abgezogen), ebenso \*\* war die Differenz von Baselinewert zu Monat 24 Wert der Retinadicke nicht angegeben, sondern wurde aus beiden Werten errechnet;\*\*\*berechneter Wert aus den Kategorien 30, 29-25, 24-20, 19-15 Buchstaben Gewinn; CSFT: central subfield thickness; LOCF: last observation carried forward; 0,5q4: 0,5mg alle 4 Wochen, 2q8: 2mg alle 8 Wochen; PRN: pro re nata, bei Bedarf; Inj.= Injektion

Für den Vergleich mit der RELATION Studie eignet sich am ehesten die RESTORE Studie, da die Ein- und Ausschlusskriterien sehr ähnlich sind.

Trotz Abbruch der RELATION nach Randomisierung von 128 Patienten (von denen 114 in dieser Arbeit betrachtet wurden), sind die Visusergebnisse von RELATION und RESTORE in vergleichbaren Dimensionen.

Das rasche Ansprechen des Visus auf die Ranibizumab-Therapie im Vergleich zu Laser wurde sowohl in RELATION als auch in RESTORE gezeigt. Dieser Vorteil gegenüber Lasertherapie kann für die Selbstständigkeit eines Patienten unter Umständen von Bedeutung sein. Für einzelne Patienten kann der Lesevisus rasch wiedergewonnen werden oder Autofahren wieder möglich werden. Wird jedoch nicht regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf wiederbehandelt, sind auch bei Ranibizumab-behandelten Patienten Visuserfolge geringer oder die Visuserfolge treten verzögert auf, wie bei der READ-II Studie gezeigt [46]. In der Arbeit von Nguyen werden die 6-Monatsergebnisse der Phase II Studie READ [42] mit 126 Patienten berichtet. Patienten mit DMÖ und Visusbeeinträchtigung wurden in der Kombinationsgruppe (Ranibizumab + Laser) an Monat 1 und 3 behandelt und in einer Ranibizumab-Monogruppe an den Monaten 1,3 und 5. Der primäre Endpunkt (Visusänderung gegenüber Baseline) wurde an Monat 6 bestimmt. Die Kombinationsgruppe schnitt mit einem Buchstabengewinn von 3,61 im Vergleich zu 7,07 Buchstaben in der Ranibizumab-Monogruppe tendenziell schlechter ab ( $p=0,08$ ; jeweils 42 Patienten pro Gruppe). Die Patienten wurden weitere 18 Monate beobachtet [46]. Die Laser Monogruppe und die Ranibizumab Monogruppe konnten bis Monat 24 zweimonatlich Injektionen erhalten. Die Kombinationsgruppe konnte dreimonatlich mit Laser und Ranibizumab behandelt werden. An Monat 24 erreichten die Patienten aller Behandlungsgruppen annähernd gleiche Visusergebnisse (7,70 Buchstaben im Ranibizumab Arm, 5,10 Buchstaben im Laserarm und 6,80 Buchstaben im Kombinationsarm). Auffällig ist aber der Unterschied im Ansprechen in den ersten 6 Monaten: Patienten, die sofort Ranibizumab in zweimonatlicher Dosierung erhalten haben, erreichten schneller einen höheren Visusgewinn. Bei Patienten mit dreimonatigen Abständen, dauerte es einige Monate länger, bis derselbe Effekt erreicht wurde. Daher ist es für Patienten sicher von Vorteil, so schnell wie möglich mit der Therapie zu beginnen bis ein stabiler Visus erreicht ist und dann regelmäßig zu kontrollieren, ob eine Wiederbehandlung nötig ist. Die Injektionsabstände, die in READ-II anfangs gewählt wurden, scheinen zu einem verzögerten Therapieansprechen zu führen. Vergleicht man die initiale Therapiephase der READ-II Studie mit anderen Studien wie RESTORE [44] oder DRCCR.net Protocol I [45], führt die monatliche Therapie zu Beginn der klinischen Prüfung zu schnellerem Eintreten des maximalen Visusgewinns.

Besonders erfolgreich scheint beim DMÖ die Behandlungsstrategie der DRCCR.net Protocol I Studie zu sein [31]. Die Dreijahresergebnisse zeigen, dass mit monatlichen Injektionen am Anfang und Visus und OCT-gestützter Wiederbehandlung bei Bedarf, nur wenige weitere Injektionen in den kommenden Behandlungsjahren nötig waren [176]. In den beiden Ranibizumab-Gruppen (sofortige Kombination mit Laser vs. Laser ab Woche 24 möglich, aber nicht verpflichtend) wurde nach drei Jahren ein Visusgewinn von 7 bzw. 10 Buchstaben erreicht, nach 5 Jahren 8 bzw. 10 Buchstaben [31, 176]. Dafür wurde im ersten Jahr durchschnittlich 8 bzw. 9 Mal injiziert, im zweiten Jahr nur mehr zwei bzw. dreimal und im dritten Jahr waren nur mehr eine bzw. zwei Injektionen nötig. Im vierten Jahr wurde im Median im Ranibizumab Arm mit verzögertem Laser nur mehr einmalig Ranibizumab appliziert. Im Ranibizumab Arm mit sofortigem Laser im vierten Jahr und bei beiden Behandlungsgruppen im fünften waren im Median gar keine Injektionen mehr notwendig, wobei die Visusgewinne auf dem hohen Niveau von Behandlungsjahr 3 gehalten wurden. Die Rolle des Lasers wird von der DRCCR.net

Gruppe nach den drei Jahres Ergebnissen zunehmend kritischer gesehen und auch nach fünf Jahren scheint der sofortige Lasereinsatz keinen Vorteil zu bringen. Es ist zwar in der Kombinationsgruppe mit sofortigem Laser im Schnitt nach drei und vier Jahren eine Injektion weniger nötig, aber die Visusergebnisse sind im Kombinationsarm mit sofortigem Laser nach 36 bzw. 60 Monaten schlechter als im Kombinationsarm mit verzögertem Lasereinsatz. Auch in der RESTORE Studie [175] sind nach 36 Monaten Therapie die Visusgewinne in der Kombinationsgruppe etwas niedriger als in der Ranibizumab-Monogruppe (6,7 vs. 8,0 ETDRS Buchstaben Gewinn), jedoch nicht signifikant. Sowohl in der DRCR.net Protocol I Studie als auch in der RESTORE Studie bleibt die Frage unbeantwortet, ob der Ranibizumab-Monoarm oder der Kombinationsarm mit Laser Photokoagulation die sinnvollere Therapie ist. Weitere Studien können hier Aufschluss geben.

Zusammengefasst liegt mit Ranibizumab ein potenter Wirkstoff vor, um den Visus der meisten Patienten zu erhalten bzw. zu verbessern. Das konnte in der RELATION Studie bestätigt werden. Mit den 4 initialen Injektionen kann schneller ein signifikant besserer Visus erreicht werden als mit der Lasermonotherapie. Sinnvoll scheint es ab Diagnose eines DMÖ monatlich bis zur Stabilität von Visus und/oder zentraler Retinadicke zu therapieren, da eine zweimonatliche Therapie erst deutlich später einen vergleichbaren Visuserfolg bringt. In Studien mit Langzeitergebnissen zeigte sich, dass eine engmaschige Kontrolle und Therapie gerade im ersten Jahr der DMÖ Behandlung enorm wichtig ist. Patienten können danach aber mit wenigen Injektionen und weniger Visiten [31, 176] im zweiten und dritten Behandlungsjahr gut auf dem zuvor gewonnen Visusniveau gehalten werden.

Nicht unerwähnt bleiben darf in diesem Kapitel die Subgruppe der RELATION-Patienten, die neben dem DMÖ zusätzlich eine PDR aufweist. Denn bei diesen 22 PDR Patienten war kein signifikanter Unterschied in der Visusentwicklung zwischen den Gruppen erkennbar (3,22 im Kombi vs. 3,20 im Laserarm). Im Gegensatz dazu wurde bei den NPDR Patienten ein signifikanter Visusgewinn zwischen Baseline und Visite 14 zu Gunsten der Kombinationstherapie festgestellt (7,18 vs. 1,59 ETDRS Buchstaben). Den Therapievergleich in der PDR Subgruppe muss man sehr vorsichtig interpretieren, da nur 4 Patienten in den Laserarm randomisiert wurden. Es wurde häufiger als im Verhältnis 2:1 in den Kombinationsarm randomisiert (18 Patienten im Kombinationsarm). Der Unterschied in den Ergebnissen kommt womöglich von der unterschiedlichen Ausgangslage bezüglich Visus ( $63,44 \pm 9,877$  Buchstaben vs.  $59,74 \pm 9,61$  Buchstaben) und CRT ( $432,59 \pm 173,87 \mu\text{m}$  vs.  $558,25 \pm 142,6 \mu\text{m}$ ) zwischen Kombi und Laserarm, so dass im Kombi-Arm durch die bessere Ausgangslage der Therapieeffekt womöglich geringer erscheint. Darüber hinaus gab es Patienten im Kombinationsarm, die durch den frühen Studienabbruch nicht ausreichend therapiert wurden und deren relativ schlechter Visuswert dann wegen der LOCF Methode bis zur Visite 14 projiziert wurde. Die deutliche Visusreduktion bei der Abschlussvisite im Vergleich zur Vorgängervisite bei 3 Patienten hätte sich womöglich durch weitere Behandlungen bei Bedarf bis Monat 12 ausgeglichen. Davon abgesehen lag bei mehr Patienten in der Kombinationsgruppe ein diffuses Makulaödem mit schlechterer Visusprognose vor, im Vergleich zu den Patienten in der Lasergruppe (siehe Kapitel 3.1.6). Eine weitere Erklärung für das schlechte Abschneiden der Kombinationstherapie bei den PDR Patienten könnte sein, dass bei diesen Patienten im Glaskörper eine höhere Menge VEGF vorliegt, als bei Patienten ohne PDR. *Funatsu et al.* haben berichtet, dass die VEGF-Konzentration im Glaskörper und im Kammerwasser bei Patienten mit aktiver PDR im Vergleich zu Patienten mit DMÖ signifikant erhöht ist [177]. Dementsprechend könnte eine höhere Konzentration oder häufigere Injektionsrate von Ranibizumab am Anfang der Therapie nötig sein um denselben Effekt zu erhalten wie bei NPDR Patienten mit DMÖ.

In der gerade laufenden PRIDE Studie (NCT01594281) wird bei 120 Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie ohne DMÖ untersucht wie sich anatomische Parameter, Visus, Biomarker und Sicherheit unter Ranibizumab mit und ohne Kombination mit der panretinalen

Laserphotokoagulation (PRP) verglichen mit PRP alleine entwickeln. Die Studie wird weitere Informationen zur Behandlung von PDR Patienten liefern.

## 4.2 Sicherheit der Therapie

Die Katarakt wird als häufigstes, schwerwiegendes, okuläres, unerwünschte Ereignis einer Ranibizumabbehandlung in der Literatur beschrieben. In der RESTORE Studie wurden innerhalb von drei Jahren von fünf Fällen berichtet (3,6 % bzw. 2,7 %) [175] und in den RISE und RIDE Studien von vier Fällen in drei Jahren, was einer Häufigkeit von 0,8 % pro Studienarm entspricht [174]. Als nicht-schwerwiegendes, unerwünschtes Ereignis wurde eine Katarakt in der RESTORE Studie in 16,3 % der Fälle beschrieben [175], in RISE/RIDE nach zwei Jahren mit 11,9 bis 23,4 % [49] und in der DRCR.net Protocol I Studie mit einer Häufigkeit von 14 % nach zwei Jahren [45]. Für spätere Zeitpunkte der RISE/RIDE und DRCR.net Protocol I Studien wurde keine Katarakthäufigkeit veröffentlicht. In den Schein-behandelten Armen der RISE/RIDE und der DRCR.net Protocol I Studie ergaben sich Katarakt-Raten zwischen 14 – 24 % [45, 49]. Das *The Visual Impairment Project* gibt Auskunft zu aktuellen Kataraktraten bei Diabetikern ohne Ranibizumabbehandlung. Nach 4,5 Jahren trat bei 555 von 2392 Patienten (23 %) eine Katarakt auf [178]. Diese Häufigkeit liegt durchaus im Bereich der oben beschriebenen Ranibizumab-Studien. Da jedoch noch keine Studiendaten zur Therapie der DMÖ Patienten mit Ranibizumab über 3 Jahre hinaus verfügbar sind, ist noch nicht klar, ob Ranibizumab bzw. die Injektionsprozedur die Kataraktrate erhöht. Im Moment gibt es keinen Hinweis auf eine veränderte Katarakthäufigkeit. In den oben genannten Publikationen unterscheiden sich die Raten zwischen Scheinbehandlung und Ranibizumabbehandlung nicht. In der RELATION Studie wurden lediglich zwei Katarakt-Fälle erfasst. Wegen der kurzen Laufzeit der RELATION Studie und der geringen Fallzahl ist es schwierig Vergleiche zu den oben genannten Studien zu ziehen. In der Fachinformation von Lucentis® wird die Wahrscheinlichkeit einer Katarakt mit *häufig* (1-10 %) angegeben.

Endophthalmitis-Fälle traten weder in der RELATION noch in der dreijährigen Laufzeit der RESTORE Studie auf [175]. In den RISE und RIDE Studien wurden nach drei Jahren sechs Endophthalmitis Fälle beschrieben (1,6 % im 0,3 mg Ranibizumab Arm bzw. 0,8 % im 0,5 mg Ranibizumab Arm) [174] und in der DRCR.net Protocol I Studie drei Endophthalmitis Fälle in drei Jahren in den Ranibizumab Gruppen [31]. Diese Unterschiede lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass in den europäischen Studien RESTORE und RELATION eventuell höhere Standards bei der intravitrealen Injektion vorherrschen als in den RISE/RIDE und der DRCR.net Protocol I Studie, die in den USA und Südamerika durchgeführt wurden.

Weitere häufige okuläre unerwünschte Ereignisse, die in der RELATION Studien beobachtet wurden, waren Augenschmerzen (19,7 % im Kombinations- und 18,4 % im Laserarm), Blutungen der Konjunktiva (9,2 % im Kombinationsarm, kein Fall im Laserarm) und vermehrter Tränenfluß (7,9 % im Kombinations- und 2,6 % im Laserarm). In den großen klinischen Studien mit Ranibizumab werden diese Fälle als häufigste Ereignisse erfasst (siehe Tabelle 83).

Ereignis (%) / Studie	RELATION (Kombi / Laser)	RESTORE (3 Jahre, alle Gruppen) [175]	RISE/RIDE (2 Jahre) [49] (Ranibizumab / Sham)	DRCR.net Protocol I (2 Jahre) (Ranibizumab / Sham) [45]
Augenschmerzen	19,7 / 18,4	15,4	17,0 / 18,7	7,9 / 0,1
Blutungen der Konjunktiva	9,3 / 0	7,5	49,3 / 31,7	10,2 / 2,4
Gesteigerter Tränenfluss	7,9 / 2,6	4,3	5,8 / 5,7	4,3 / 4,1

**Tabelle 83: Übersicht der häufigsten okulären unerwünschten Ereignisse in Prozent in den Studien RELATION, RESTORE, RISE/RIDE und DRCR.net Protocol I**

Eine Erklärung für die hohe Rate an Bindehautblutungen wird in den Publikationen der RISE/RIDE Studie nicht abgegeben [49]. Ob auch diese Unterschiede in der Ereignishäufigkeit mit der Durchführung der Studie auf dem amerikanischen Kontinent im Zusammenhang stehen, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In der Fachinformation von Ranibizumab werden die Nebenwirkungen Augenschmerzen, verstärkter Tränenfluss, Bindehautblutung mit der Wahrscheinlichkeit *sehr häufig* genannt. Der Kausale Zusammenhang mit der Injektionsprozedur ist offensichtlich und in vielen Studien gegenüber der Scheinbehandlung erhöht.

In der RELATION Studie wurden verschiedene systemische unerwünschte Ereignisse berichtet, wobei es sich um Einzelfälle handelte.

Als häufigste nicht-schwerwiegenden Ereignisse traten Nasopharyngitis, Hypertension, Kopfschmerzen und Rückenschmerzen auf. In den Publikationen der RISE/RIDE Studie wurden die Häufigkeiten für diese Ereignisse nicht berichtet. Die entsprechenden Raten in der RESTORE und DRCR.net Protocol I Studie sind in Tabelle 84 zusammengefasst.

Ereignis (%) / Studie	RELATION (Kombi/Laser)	RESTORE (3 Jahre, alle Gruppen) [175]	DRCR.net Protocol I (2 Jahre) [45] (Ranibizumab/Sham)
Nasopharyngitis	23,7 / 15,8	23,3	7,8 / 2,4
Hypertension	6,6 / 18,4	13,3	4,3 / 1,0
Kopfschmerzen	6,6 / 5,3	5,8	4,5 / 2,9
Rückenschmerzen	3,9 / 7,9	8,3	2,4 / 1,7

**Tabelle 84: Übersicht der häufigsten systemischen unerwünschten Ereignisse in Prozent in den Studien RELATION, RESTORE und DRCR.net Protocol I**

Es ist nicht davon auszugehen, dass bei den Ereignissen ein kausaler Zusammenhang zur Ranibizumabtherapie vorliegt, da in den scheinbehandelten Gruppen die Rate dieser Ereignisse in vergleichbarem Umfang auftrat. In der Fachinformation von Ranibizumab werden lediglich Kopfschmerzen und Nasopharyngitis gelistet (sehr häufig). Die Rate für Rückenschmerzen und Hypertension ist in den Studien auf dem Niveau der Vergleichstherapie, so dass diese Ereignisse nicht in der Fachinformation gelistet werden.

Vergleicht man die Sicherheitsdaten der Prüfmedikation der RELATION Studie mit den bisheriger Ranibizumab Studien, ergeben sich keine Änderungen im Sicherheitsprofil von Ranibizumab.

### 4.3 Betrachtung der Biomarker in der RELATION Studie

Von vielen der untersuchten Biomarker war bekannt, dass Sie eine Rolle bei der Entstehung der DR und des DMÖ spielen (siehe Kapitel 1.4.5). Mittels Serumproben konnten aber bis jetzt kaum Zusammenhänge hergestellt werden [137]. Die RELATION Studie bot sich als große randomisierte Studie an, zu mehreren Zeitpunkten Proben zu entnehmen und mit einer großen Patientenzahl zu prüfen, ob die im Serum bestimmten Biomarker Aufschluss über das Krankheitsgeschehen geben. Die RELATION Studie ist außerdem eine der ersten Studien, die eine Auswirkung von wiederholten Ranibizumab-Injektionen bei Patienten mit diabetischem Makulaödem auf die Serumspiegel diverser Biomarker untersuchte.

#### 4.3.1 Entwicklung der Biomarker über den Studienzeitraum

In Tabelle 85 werden die p-Werte der Medianvergleiche zwischen den Messzeitpunkten dargestellt und signifikante Änderungen farblich hinterlegt. Es gibt einige signifikante Unterschiede der Mediane während des Messzeitraums vor allem bei IL-8, Apo-CIII und sVCAM-1.

p-Werte	V1 vs. V2-5		V1 vs. V6		V1 vs. V14		V6 vs. V14	
	Kombi	Laser	Kombi	Laser	Kombi	Laser	Kombi	Laser
IL-8	<b>0,007</b>	0,345	0,449	0,428	0,172	<b>0,013</b>	0,609	<b>0,032</b>
IL-10	0,225	0,498	0,763	0,162	0,145	<b>0,002</b>	0,911	0,717
IL-17	<b>0,180</b>	<b>0,109</b>	<b>0,046</b>	0,063	<b>0,002</b>	0,852	0,232	0,145
MCP-1	0,131	0,080	0,100	0,877	0,843	0,353	0,242	0,056
VEGF	<b>0,424</b>	0,138	<b>0,460</b>	0,309	0,277	0,122	0,984	<b>0,040</b>
Apo-A1	0,374	0,893	0,126	0,688	<b>0,024</b>	0,088	0,512	<b>0,028</b>
Apo-A2	0,328	0,893	0,258	<b>0,428</b>	0,709	<b>0,925</b>	0,213	0,886
Apo-B	0,285	<b>0,500</b>	0,968	<b>0,325</b>	0,126	0,840	<b>0,005</b>	0,304
Apo-CII	0,929	0,893	0,325	0,975	0,229	<b>0,313</b>	0,657	<b>0,317</b>
Apo-CIII	<b>0,021</b>	<b>0,500</b>	0,941	<b>0,869</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,007</b>
Apo-E	0,859	<b>0,893</b>	0,258	0,586	0,268	0,264	0,846	0,977
sVCAM-1	<b>0,033</b>	<b>0,043</b>	<b>0,030</b>	<b>0,171</b>	0,369	0,183	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
sICAM-1	<b>0,026</b>	0,225	0,291	<b>0,221</b>	0,115	0,166	0,080	<b>0,001</b>
IL-6	<b>0,722</b>	<b>0,500</b>	0,460	<b>0,497</b>	0,414	<b>0,326</b>	0,985	0,568

Tabelle 85: p-Werte der Medianvergleiche der Biomarkerkonzentrationen zwischen den Visiten. Hypothese: Medianwerte über die Visiten gleich, berechnet mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für verbundene Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau.

Darüber hinaus lassen sich einige Tendenzen feststellen, die in der Übersicht durch die fette Schriftart ohne farbliche Markierung hervorgehoben sind. Die großen Streuungen bei den Werten könnten ein Grund dafür sein, dass keine weiteren Signifikanzen vorliegen. Höhere Fallzahlen oder mehrere Messungen derselben Probe können in zukünftigen Untersuchungen diese Tendenzen bestätigen oder ausräumen.

#### IL-8

Bei IL-8 (oder CXCL-8) ist in der Lasergruppe der Median an Visite 14 signifikant niedriger als an den Visiten 1 und 6. In der Kombinationsgruppe ist der Median der Konzentrationen an der Sammelvisite (V2-V5) signifikant niedriger als an Visite 1. IL-8 wurde 1992 als ein Chemokin beschrieben, dass an der Angiogenese beteiligt ist [130]. Über die Bindung an den CXC-Rezeptor 2

(CXCR2) wird die Angiogenese vermittelt [131]. Zusammen mit MCP-1 ist IL-8 an der Bildung von Gefäßvorstufen aus Endothelzellen und an der vermehrten Expression von MMP-1 aus Endothelzellen beteiligt [132]. Die Beeinflussung der Matrix Metalloproteasen könnte bei der Permeabilität der Gefäße, die beim diabetischen Makulaödem auftritt eine Rolle spielen [132]. Die erhöhte Expression von Matrix Metalloproteasen, die beim Umbau der Extrazellulärmatrix beteiligt sind, werden mit diabetischer Nephropathie [179] und proliferativer diabetischer Retinopathie [180] in Verbindung gebracht. Die Wirkung von IL-8 und/oder MCP-1 auf MMPs könnte also eine Rolle in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie und des diabetischen Makulaödems spielen.

Nach Untersuchungen am HUVEC Zell-Modell wurde berichtet, dass VEGF die IL-8 Expression direkt induziert und ein VEGF-Inhibitor sowohl VEGF als auch IL-8-Bildung hemmt [181]. Ranibizumab führt also möglicherweise zu verringerten IL-8 Konzentrationen. Das könnte eine Erklärung liefern, warum am Anfang der Therapie im Kombinationsarm die Konzentration von IL-8 reduziert ist. Der Median der IL-8 Konzentration ist an V6 leicht, aber nicht signifikant niedriger als an V1, was diese Theorie unterstützt.

Unklar ist warum die Konzentration von IL-8 im Laufe der Studie nur in der Laser-Monogruppe niedriger wird, im Gegensatz zur Kombinationsgruppe. Es könnte sich einerseits um zufällige Schwankungen handeln. Andererseits ist es möglich, dass die intravitreale Ranibizumabinjektion zusammen mit der Lasertherapie eine anfängliche Gegenregulation hervorruft, was der Laser alleine nicht bewirkt. Unter Umständen induziert die Hemmung von VEGF im Auge eine Erhöhung von systemischem IL-8, so dass die Konzentration wieder im Bereich vor der initialen Kombinations-Therapie liegt. Es kann auch sein, dass die Patienten in der Phase, in der nur nach Bedarf injiziert wurde, wieder VEGF nachbilden, was verzögert die IL-8 Produktion stimuliert.

## **IL-17**

Im Kombinationsarm an Visite 6 und 14 ist die Konzentration von IL-17 niedriger, als an Visite 1.

*Banerjee et al.* und *Suzuki et al.* haben IL-17 im Glaskörper von Patienten untersucht und berichten, dass IL-17 entweder nicht detektierbar war [182] beziehungsweise in keinem Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer DR steht [183].

IL-17A bindet an den IL-17 Rezeptor [184]. Je nach Zielstruktur verursacht das pro-inflammatorisch wirkende IL-17 die Expression von diversen Zytokinen wie Colony stimulating factors (GM-CSF, G-CSF), Chemokinen (z.B. CXCL-1, CXCL-6, CXCL-8, CXCL-10), Metalloproteasen, IL-5, IL-6, Eosinophile Granulozyten, ICAM-1, GCP-2, CINC, CCL-2 (MCP-1), TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , neutrophil elastase (NE) und Myeloperoxidase (MPO), VEGF, PGE1, PGE2 (siehe Review: [138]).

Ob es darüber hinaus eine Interaktion von IL-17A und VEGF gibt, wurde bis jetzt nicht berichtet und bleibt zu untersuchen. Es ist auffällig, dass zu den Zeitpunkten V6 und V14 in der Kombigruppe die IL-17A Konzentration niedriger ist, als vor Beginn der Therapie. Da normalerweise IL-17A die Expression von VEGF auslöst [138], hätte man keine Reaktion oder Gegenreaktion im Sinne einer Überexpression von IL-17A erwartet. Ob es durch die VEGF Therapie generell zu einer Reduktion des Entzündungsgeschehens am Auge kommt und dieser Effekt sich auf die systemischen Gegebenheiten niederschlägt, bleibt eine weitere Theorie, die es zu beweisen gilt. Eine lokale, im Auge verringerte Entzündung könnte womöglich eine Reduktion der IL-17A Konzentrationen systemisch bewirken.

Eine erste Proof of Concept Studie hat eine antientzündliche Wirkung eines systemisch applizierten IL-17-Antikörpers bei Patienten mit Uveitis berichtet [185]. Reduzierte Entzündungsparameter, verbesserter Visus und Reduktion der systemischen Steroidgabe konnten in der genannten Studie bei

einigen der 16 untersuchten Patienten festgestellt werden. Die Ergebnisse der Phase 2 und 3 Studien wurden noch nicht publiziert (CAIN457A2208, CAIN457C2301/E1, CAIN457C2302/E1, CAIN457C2303/E1, CAIN457C2399) und teilweise frühzeitig beendet. Ob die Hemmung von IL-17 ein möglicher Ansatzpunkt für die Therapie eines DMÖ ist, bleibt zu untersuchen. Denkbar wäre, dass die Hemmung der entzündlichen Kaskade beim DMÖ einen Effekt hat, jedoch stellt die invasive systemische Gabe (z.B. von AIN457) keine Alternative zur intravitrealen, sehr wirksamen Therapie mit VEGF-Hemmern da. Eine okuläre Formulierung eines IL-17 Hemmers müsste entwickelt werden, um mit intravitreal applizierten VEGF-Hemmern konkurrieren zu können.

## **VEGF**

In keiner der beiden Behandlungsgruppengruppen wird die VEGF Konzentration im Laufe der Studie beeinflusst. Nur die Konzentration zwischen V6 und V14 im Laserarm ist signifikant verschieden.

Ranibizumab geht im Hasenmodell nur in geringen Mengen in die Blutbahn über und ist nach 7 Tagen nicht mehr detektierbar [186]. In der IVAN Studie [187] wurden bei AMD Patienten an Monat 3, 6 und 12 Blutproben entnommen und die VEGF Konzentration bestimmt. Die VEGF Konzentration war nach Ranibizumab Gabe sowohl bei monatlicher, als auch bei bedarfsorientierter Wiederbehandlung, nach einem Jahr nicht signifikant, aber leicht verringert. Auch *Avery et al.* haben berichtet, dass bei Patienten mit feuchter AMD nach wiederholter Gabe von Ranibizumab keine langfristige Reduktion der systemischen VEGF Konzentration eintrat [188]. Die Avery Gruppe hat die systemische Konzentration von Ranibizumab, Bevacizumab und Aflibercept sowie von VEGF drei Stunden nach der ersten und dritten Injektion sowie an Tag 1, 3 7 und 28 nach Applikation getestet. Nach Ranibizumab Gabe wurde das systemische VEGF etwas verringert, hatte aber nach 28 Tagen wieder die Werte vor Injektion erreicht. Deutlich unter dem Baselinewert hemmten Bevacizumab und Aflibercept das systemische VEGF nach 30 Tagen und an Tag 90 zeichnete sich ein kumulativer Effekt der monatlichen Injektionen ab. Ob diese verstärkte Hemmung von VEGF durch Aflibercept und Bevacizumab im Gegensatz zu Ranibizumab einen Einfluss auf unerwünschte Ereignisse hat, konnte in den bisherigen Vergleichsstudien bei AMD nicht gezeigt werden [187, 189, 190]. Größere Vergleichsstudien sind vermutlich nötig und es ist zu bedenken, dass auf Grund der Ein-/Ausschlusskriterien von klinischen Prüfungen nicht unbedingt das typischen Patientenkollektiv von AMD und DMÖ Patienten erfasst wird, da Patienten in der klinischen Routine unter Umständen mehr Komorbiditäten aufweisen. Die bereits in Kapitel 4.1 erwähnte DRRCR.net Protocol T Studie, die den Einsatz von Ranibizumab, Aflibercept und Bevacizumab bei 660 Patienten untersucht, hat Blutproben von Patienten gewonnen um die VEGF-Konzentrationen zu bestimmen. Diese Ergebnisse wurden jedoch noch nicht präsentiert.

Eine besondere Bedeutung könnte die Auswahl der VEGF-Inhibitoren bei der Frühgeborenen-Retinopathie spielen. In dieser Indikation ist eindeutig ein Molekül mit möglichst geringer systemischer Halbwertszeit und wenig Effekt auf die systemische VEGF Konzentration zu bevorzugen. Eine klinische Prüfung, die den Effekt von Ranibizumab bei Frühgeborenen-Retinopathie untersucht, wurde vor kurzem gestartet (NCT02134457)

Bis jetzt gibt es noch keine Studie die den Einfluss von intravitreal injiziertem Ranibizumab auf die VEGF-Konzentrationen bei DMÖ Patienten untersucht hat. Die Ergebnisse der RELATION passen zu den Ergebnissen der IVAN Studie bei AMD Patienten [187]. Denn die VEGF Konzentration ist bei den DMÖ Patienten nach vier aufeinanderfolgenden monatlichen Injektionen im Kombinationsarm nicht verringert.

In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass nach Lasertherapie die VEGF-Konzentration im Glaskörper und im Kammerwasser [191, 192] verringert ist. Mehrere Studien stützen die Theorie der



VEGF-Senkung. Eine davon besagt, dass durch Photokoagulation diejenigen Zellen zerstört werden, die VEGF exprimieren [193]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sinkt der Sauerstoffbedarf des Netzhautgewebes, da durch die Laserbehandlung das unterversorgte Gewebe zerstört wird. Die zerstörten Gefäßendothelzellen, Nervenzellen etc. bilden kein VEGF mehr [194]. Darüber hinaus könnten durch die Lasertherapie antiangiogene Substanzen wie Angiostatin ausgeschüttet werden, die angiogene Substanzen runterregulieren [195].

Im Laserarm ist die VEGF Konzentration an Visite 14 signifikant erhöht. Hier kann auf die Arbeit von *Lip* verwiesen werden [196], die zeigt, dass sich durch Laserkoagulation die VEGF Konzentrationen auch systemisch verändern kann. Jedoch ist bei den RELATION Patienten im Kombinationsarm die VEGF Konzentration nicht erhöht. Es könnte sich womöglich um eine zufällige Schwankung der systemischen VEGF Konzentration handeln.

Ein wichtiges Ergebnis der VEGF-Messung der RELATION Studie ist, dass die Serumkonzentration auch nach kontinuierlicher Ranibizumabgabe in den ersten 4 Monaten nicht beeinträchtigt ist. Das könnte vor allem für VEGF-sensitive Gruppen wie Patienten mit Frühgeborenen-Retinopathie von Bedeutung sein. Denn bei diesen Patienten soll unter keinen Umständen das systemische VEGF-Gefüge beeinflusst werden. Aber auch bei erwachsenen Patienten ist eine möglichst niedrige anti-VEGF Exposition anzustreben, da die Auswirkungen der lokal applizierten anti-VEGF Substanzen auf den systemischen VEGF-Kreislauf noch weitgehend unerforscht sind.

### **Apo-CIII**

Trotz intensiver Recherche gibt es keinen Hinweis darauf, wieso sich gerade die Konzentration von Apo-CIII unter Therapie ändert. Die Konzentrationsverteilungen schwanken sehr stark, vor allem an Visite 1 und Visite 6.

APO-Cs finden sich in Chylomikronen, VLDL und HDL wieder [197]. Für folgende Schritte im Fettstoffwechsel sind sie unter anderem zuständig:

- Apo-CII ist ein Aktivator der LPL und wird für die Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen benötigt. Ein Fehlen führt zu stark erhöhten Triglyceridspiegeln im Plasma [198].
- Apo-CIII inhibiert die Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen. Apo-CIII in den Lipoproteinen hat starken Einfluss auf die Triglycerid Metabolisierung im Plasma und spielt möglicherweise eine Rolle in der Triglyceridämie. Apo-CIII wird in Darm und Leber produziert und ist das häufigste Apolipoprotein in VLDL [198].

Pathologische Probleme entstehen wenn Lipoproteine falsch metabolisiert werden wie z.B. Cholesterin in Arterienwände, genetisch bedingt oder durch Überangebot [199].

Erhöhte Konzentrationen von Apolipoprotein-CIII sind mit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Veränderungen bei Typ 1 Diabetikern mit normalem Fettstoffwechsel assoziiert [200].

In der FIELD Studie [23] wurde berichtet, dass mit Fenofibrat behandelte Patienten signifikant später eine Laserintervention benötigten. Patienten, die schon eine DR hatten, hatten signifikant seltener eine Progression um zwei ETDRS-Levels des Retinopathiestadiums, und darüber hinaus signifikant seltener ein Makulaödem oder eine Laserbehandlung. Die Apo-CIII Konzentration wird durch Fibrat reduziert [201].

Warum aber die Apo-CIII Konzentration signifikant vor allem im Laserarm verändert ist, bleibt unklar. Um den Effekt zu untersuchen wären womöglich Messungen von Apo-CIII Genexpression nach Laserbehandlung in der Retina von Tiermodellen interessant.

### **sVCAM-1**

In beiden Behandlungsgruppen ist die Visite 1 Konzentration von sVCAM-1 höher als nach den vier initialen Injektionen. Im Kombinationsarm ist diese Erhöhung signifikant. Von Visite 6 zu Visite 14, also nach der PRN Behandlungsphase, steigt die sVCAM-1 Konzentration in beiden Gruppen wieder signifikant an und erreicht in etwa die Konzentration von Visite 1. Womöglich hat also die lokale Laser und/oder Ranibizumab Therapie einen Einfluss auf die systemische sVCAM-1 Serum Konzentration.

Adhäsionsmoleküle wie sVCAM-1 und sICAM-1 spielen eine Rolle beim Eindringen von Immunzellen durch die Endothelzellen. Immunzellen rollen an Endothelzellen der Blutgefäße entlang und haften vermittelt durch Selektine locker an, bis sie sich wieder lösen und weiterwandern. Werden die Endothelzellen bzw. Immunzellen durch Chemokine aktiviert, bilden sich Adhäsionsmoleküle: die Integrine. Durch Konformitätsänderung der Integrine binden sie an ihre Liganden auf der Endothelzelle. Die Scherkräfte vermögen nun nicht mehr die Immunzellen von der Endothelzelle zu lösen. Erst danach kann die Immunzelle durch die Endothelzelle ins Gewebe eindringen [202].

ICAM-1 und VCAM-1 stellen Liganden der Integrine dar [202], die von Endothelzellen nach Aktivierung von Zytokinen exprimiert werden [203], sowohl in löslicher Form, als auch fix gebunden an Endothelzellen [204]. VCAM-1 spielt eine essenzielle Rolle bei der Anheftung von Lymphozyten an (mit TNF- $\alpha$ ) aktivierten Endothelzellen [154] und bei der Anheftung von Monozyten an Endothelzellen, aber nicht bei der Anheftung von Granulozyten an Endothelzellen [152, 153]. Außerdem scheint VCAM-1 sowohl bei akuten als auch chronischen immunologischen Prozessen beteiligt zu sein [152].

Bei Mäusen mit Überexpression von VEGF kann ein VCAM-1/VLA-4 Antikörper (VLA-4 ist eine Zielstruktur von VCAM-1) bewirken, dass die vermehrte Zelladhäsion von Leukozyten normalisiert wird [205]. *Kim et al.* haben in einem HUVEC Zellenmodell bewiesen, dass VEGF die Bildung von sICAM und sVCAM zeitabhängig stimuliert [206].

Das könnte der Grund dafür sein, warum die Konzentration von sVCAM-1 am Studienanfang der RELATION reduziert ist. VEGF wird lokal bis Visite 6 gehemmt. Auch wenn VEGF selbst im Serum nicht signifikant verringert ist bzw. sich die Konzentration 1 Monat nach der letzten Injektion normalisiert hat, kann es möglicherweise zeitverzögert zur Anpassung der sVCAM-1 Konzentration an die VEGF-Level kommen. Das würde die niedrige Konzentration von sVCAM-1 an Visite 6 in der Kombinationsgruppe erklären. Da die Patienten ab Visite 6 nur bei Bedarf behandelt wurden, stellt sich womöglich durch die niedrigere Injektionsfrequenz bei den meisten Patienten schnell wieder die sVCAM-1 Ausgangskonzentration ein.

Zu beantworten bleibt die Frage wie es zur Reduktion der sVCAM-1 Konzentration im Laser Arm kommen könnte.

Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Effekt von retinalem Laser auf die Konzentration von Biomarkern befasst. *Xiao et al.* haben die Retina von Mäusen mit Laser behandelt und eine erhöhte Aktivität von bFGF (basic fibroblast growth factor) gefunden [207]. In einer weiteren Arbeit wurde ein senkender Effekt von Panretinaler Laserphotokoagulation auf die Plasmakonzentration von VEGF gefunden [196]. Es wäre also durchaus denkbar, dass auch die mildere DMÖ-Lasertherapie einen

systemischen Effekt auf die VEGF-Konzentration hat. Wenn nun, wie berichtet, VEGF die sVCAM-1 Konzentration erhöht, wäre somit umgekehrt durch eine kurzfristige VEGF-Senkung eine niedrigere VCAM-1 Konzentration im Serum denkbar.

Die Rolle von sVCAM-1 bei den verschiedenen Diabetes Stadien und anderen Krankheiten wird in Kapitel 4.4 beschrieben.

### **Weitere Biomarker in der RELATION-Studie**

Da bei den übrigen Biomarkern nur ein oder zwei signifikante Veränderungen in verschiedenen Gruppen gemessen wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um zufällige Schwankungen handelt. Es gibt keine anderen Biomarker, die an Visite 6 einen signifikant höheren oder niedrigeren Wert aufweisen. Es wäre ein eindeutiger Hinweis auf einen Einfluss der Therapie auf die systemischen Biomarkerkonzentrationen, wenn an Visite 6, nach der intensiven Behandlung am Studienanfang, eine Veränderung in der Biomarkerkonzentration vorliegen würde. Denn bis zur Visite 6 wurden alle Patienten mit ein bis zwei Laserbehandlungen und 66 % im Kombinationsarm zusätzlich mit vier Injektionen Ranibizumab in monatlichen Abständen behandelt.

### **4.3.2 Biomarker im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen: Korrelation bei Visite 1 und Baseline**

Ein weiteres Ziel der RELATION Studie war es, Biomarker zu finden, die möglicherweise einen Aufschluss über die Krankheitsprogression geben können. Die Korrelation eines Biomarkers mit der Retinadicke könnte hilfreich sein um schon beim Hausarzt mögliche Risiken für die Sehkraft festzustellen. Da Diabetiker regelmäßig beim Hausarzt oder Diabetologen untersucht werden, würde durch einfache Bluttests eine Art Vorscreening auf das DMÖ gemacht werden können und Diabetiker könnten womöglich früher oder zielgerichteter zum Augenarzt überwiesen werden und unnötige Besuche vermeiden.

In der RELATION Studie wurde kein Zusammenhang zwischen den V1 Werten der Biomarkerkonzentrationen mit verschiedenen Baselinefaktoren gefunden. Die Biomarkerkonzentrationen korrelierten nicht mit den Baselinefaktoren Visus, zentrale Retinadicke, die vom Zentrum gemessen wurde, Foveal Center Point, Central Subfield Mean Thickness, HbA1c, Geschlecht, Diabetestyp (1 oder 2) und Alter.

Mit den in dieser Arbeit bestimmten Biomarkern haben sich außerdem keine Korrelationen mit den Stadien NPDR und PDR ergeben. Tendenziell sind Serumkonzentrationen von IL-8, MCP-1, Apo B, Apo CII und Apo CIII bei NPDR Patienten erhöht. Die VEGF und IL-6 Serum Konzentration waren bei PDR Patienten tendenziell höher. Keine Korrelation der Biomarkerkonzentration mit den Retinopathiestadien, den verschiedenen DMÖ-Typen oder dem Ischämiegrad konnte festgestellt werden.

In einer monozentrischen Studie wurden Serumproben von 28 Gesunden, 21 Patienten ohne DR, 49 NPDR und 46 PDR Patienten untersucht [137]. Es wurden signifikante Unterschiede in der VEGF-Konzentration zwischen den Patientengruppen festgestellt. Wobei es aber keinen Unterschied zwischen NPDR und PDR Patienten gab. Es fehlte jedoch die Information, bei wie vielen der PDR und NPDR Patienten ein Makulaödem vorlag. Die MCP-1 Werte stiegen signifikant mit der DR-Progression an. Das konnte in der RELATION Studie nicht bestätigt werden, die Tendenz war eher umgekehrt. *Ozturk et al.* [137] konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Proliferationsstadium und Biomarkern feststellen.

*Meleth et al.* untersuchten in einer monozentrischen Studie mit Serumproben von 93 Patienten mit Diabetes den Zusammenhang von Retinopathiestadium mit diversen Biomarkern aus dem Serum, darunter IL-8, IL-6, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 und VEGF [159]. Wie schon in den anderen Studien stellte auch diese Gruppe keinen Zusammenhang mit dem Retinopathiestadium fest. Immunhistochemisch konnte MCP-1 und ICAM-1 in der Retina von Patienten nachgewiesen werden [159].

Die Gruppe um Maioli berichtete von Typ 1 Diabetikern, deren Serumkonzentration von Apo-A1 bei Patienten mit aktiver DR höher waren als bei DR Patienten ohne aktive Läsionen [208].

*Lee et al.* berichteten in einer monozentrischen Studie bei Typ 2 Diabetikern mit 46 DR Patienten, dass die IL-6 Serumkonzentration bei PDR-Patienten im Gegensatz zu NPDR Patienten signifikant erhöht war [136]. Eine Tendenz dahingehend wurde auch in der RELATION Studie beobachtet. In einer japanischen Studie wurde berichtet, dass der Status des diabetischen Makulaödems (nicht vorhanden, fokal, diffus oder cystoid) mit der Plasma IL-6 Konzentration korrelierte [163]. Diese Ergebnisse konnten in den Untersuchungen der Serumkonzentration in der RELATION Studie nicht bestätigt werden. Es gab keinen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Ödem Arten und der IL-6 Konzentration, jedoch gab es Tendenzen bei IL-17, Apo-AIII (höhere Konzentration bei diffuser Leckage) und MCP-1 (niedrigere Konzentration bei diffuser Leckage). In der Literatur gibt es zu den Tendenzen von IL-17A und MCP-1 bis jetzt keine Beobachtungen.

Anhand der Untersuchungsergebnisse der RELATION lassen sich keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen Krankheitsgeschehen bei Baseline und Serum Biomarkerkonzentrationen ableiten. Eine weitere Standardisierung der Probenentnahme und eine größere Fallzahl könnten jedoch Tendenzen erhärten. Im Moment ist noch nicht absehbar, dass mit einer Blutprobe der Status am Augenhintergrund abgeleitet werden kann.

### **4.3.3 Biomarker und Begleittherapie: Signifikante Unterschiede**

In Kapitel 3.2.18 wurden die Begleittherapien der RELATION-Patienten vorgestellt, sowie die Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen bei Einnahme häufig eingesetzter Medikamente beschrieben.

In der RELATION Studie war bei Patienten mit RAAS- und Sartan-Therapie die Apo-B-Konzentration signifikant reduziert. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass Sartane die LDL-Konzentration verringern können [209]. Eine kleine Studie mit sechs Patienten mit Nephropathie und Proteinurie hat gezeigt, dass eine RAAS-Blockade die Apo-B-Konzentration signifikant hemmen kann [210]. Hintergrund dafür könnte der Zusammenhang zwischen RAAS-Kaskade und Hyperlipidämie sein, wie von Ferrario zusammengefasst [211]. Angiotensin-II führt zu vermehrter Bildung von oxidiertem-LDL, das bei der Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen eine Rolle spielt. Die Hemmung der RAAS-Kaskade könnte also umgekehrt zur Reduktion von oxidiertem-LDL führen und somit von Apo-B, das ein Bestandteil des LDLs ist. Der Einfluss von Sartanen auf die Apo-AI Konzentration wurde in der Literatur noch nicht berichtet und bleibt zu untersuchen. In der RELATION-Studie war die Apo-AI-Konzentration bei Sartan-Gabe signifikant verringert.

Patienten, die NO-freisetzende Medikamente einnahmen, wiesen in der RELATION-Studie verringerte Apo-CIII und Apo-E Konzentrationen auf. In der RAAS-Kaskade führt vermehrt gebildetes Angiotensin-II zur Reduktion der NO-Freisetzung über eNOS. Eine NO-freisetzende Substanz, die bei Mäusen getestet wurde, konnte die Apo-CIII-Konzentration reduzieren [212]. Der Einfluss der NO-Freisetzung auf oxidativen Stress und die gleichzeitige Wirkung auf VLDL könnte für die Reduktion von Apolipoprotein-CIII verantwortlich sein. Heterozygote Apo-E-Defizienten

Mäuse entwickeln eine Dyslipidämie und produzieren weniger NO als Wildtypmäuse [213]. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass vermehrtes NO einen positiven Effekt auf den Lipidstoffwechsel hat [214-216]. Das könnte auch der Grund dafür sein, warum in der RELATION-Studie Patienten, die NO-freisetzende Medikamente anwenden, eine verringerte Apo-E-Konzentration haben.

Es gibt Hinweise darauf, dass eine Blockade des RAAS-Systems zu verringerter IL-17-Konzentration führt [217]. Bei MS- und Plasmodieninfektions-Modellen wurde der Einsatz von ACE-Hemmern als mögliche immunmodulatorische Therapie diskutiert [217, 218]. In der RELATION Studie wurde bei 54 % der Patienten ein ACE-Hemmer eingesetzt, 32 % der Patienten erhielten Ramipril. Der Einfluss von ACE-Hemmer auf IL-17 könnte die niedrigeren IL-17 Konzentrationen unter Therapie bei den RELATION-Patienten erklären.

Auch bei Patienten, die Diuretika einnahmen, lagen signifikant verringerte IL-17-Konzentrationen vor. Zu Diuretika und IL-17 findet sich lediglich ein Hinweis einer Chilenischen Gruppe, die bei Spironolacton-Einsatz eine verringerte IL-17 Konzentration festgestellt hat [219]. In der RELATION Studie wurden lediglich zwei Patienten mit Spironolacton behandelt. Hydrochlorothiazid und Torasemid wurden als häufigstes Diuretikum in der RELATION eingesetzt und zeigten keinen Unterschied in den IL-17 Konzentrationen. Bis jetzt gibt es keine Literatur die neben Spironolacton von Diuretika-abhängiger Änderung der IL-17 Konzentrationen berichtet. Diese könnte aber auf die Mineralocorticoide Wirkung des Spironolacton zurückzuführen sein [219]. Weiter Untersuchungen sollten den möglichen Einfluss der Diuretika auf IL-17 klären.

RELATION-Patienten, die Hydrochlorothiazid einnahmen, wiesen eine signifikante VEGF-Reduktion auf. Wegen der angiogenen Vorgänge bei Hypertension haben *Chung et al.* die Wirkung von Hydrochlorothiazid auf die VEGF-Konzentrationen von 20 Patienten analysiert [220]. Die Gabe von Hydrochlorothiazid hatte in den ersten 12 Wochen der Therapie keinen Einfluss auch die VEGF-Konzentrationen. Langzeiteffekte wurden nicht berichtet. Die RELATION Patienten waren womöglich schon deutlich länger unter Hydrochlorothiazid-Behandlung. Der Einfluss einer Langzeitgabe auf die VEGF-Konzentrationen sollte in weiteren Untersuchungen betrachtet werden, um mögliche Effekte zu bestätigen.

Patienten, die in der RELATION-Studie Schilddrüsenpräparate einnahmen, hatten signifikant niedrigere Apo-AI, Apo-AII und Apo-B-Konzentrationen als Patienten, die keine Schilddrüsenpräparate benötigten. Verschiedene Studien haben den Einfluss von L-Thyroxin auf den Lipidstoffwechsel untersucht und widersprüchliche Ergebnisse gezeigt [221-224]. In den meisten Studien hatten Patienten mit L-Thyroxin-Therapie eine reduzierte Konzentration von Apo-AI. In einigen Studien wurde auch von verringerten Apo-B- und Apo-CIII-Level berichtet, teilweise aber auch von erhöhten Apo-B-Konzentrationen. Apo-AII Konzentrationen blieben unverändert. Bei der Einordnung der RELATION-Patienten ist zu beachten, dass nur zehn Patienten eine Therapie mit Schilddrüsenhormonen erhalten haben. Eine höhere Fallzahl kann hier vermutlich mehr Aufschluss über die Konzentrationsänderungen der Apolipoproteine bei Patienten mit Schilddrüsenhormontherapie geben.

Die 60 % der RELATION-Patienten, die Humaninsulin applizierten, wiesen geringere IL-8 und IL-10 Konzentrationen auf als Patienten, die kein Humaninsulin benötigten oder ausschließlich andere Insuline verwendeten. Patienten zeigten nach Einstellung auf eine intensiviertere Insulintherapie signifikant verringerte IL-10 Konzentrationen [225]. Es gibt Hinweise darauf, dass die IL-8 Konzentration mit einer Insulinresistenz korreliert [226, 227]. Sechs Stunden nach Gabe einer Insulin-Infusion war die IL-8-Konzentration nicht verändert [228]. Akute Hyperinsulinämie führte bei nicht-Diabetikern zu reduzierten IL-8- und IL-10-Konzentrationen, aber nicht bei gesunden Probanden, mit

Diabetes in der Familienanamnese [229]. Weitere Untersuchungen zeigten eine Korrelation der IL-8 Konzentrationen mit dem HbA1c [230]. In der RELATION Studie korrelieren die HbA1c-Werte nicht mit der IL-8 Konzentration bei Beginn der Studie. Jedoch hatten Patienten, die Insulin-Therapie erhielten einen signifikant höheren HbA1c (Median 6,9 vs. 7,3;  $p=0,007$  berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test auf dem 95 % Signifikanzniveau). In weiteren Untersuchungen bleibt zu klären wie Insulingabe, IL-8, IL-10 und der HbA1c zusammenhängen.

Bei Einnahme von Metoprolol waren die IL-8 und IL-10 Level der RELATION Patienten signifikant reduziert. In der Literatur berichten nur wenige Paper über den Einfluss von Metoprolol auf die Konzentration von IL-8 und IL-10. Nach 2-wöchiger Metoprolol Einnahme wiesen Patienten mit Herzinsuffizienz keine veränderte IL-8-Konzentration auf, jedoch eine signifikant verringerte IL-10 Konzentration [231]. In einer anderen Studie, die Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nach Metoprolol-Gabe untersuchte, änderten sich die Konzentrationen von IL-8 und IL-10 weder nach 3-monatiger, noch nach 11-monatiger Einnahme [232]. Bei Patienten mit Kardiomyopathie war die IL-10 Konzentration 12 Wochen nach Start einer Betablockertherapie signifikant reduziert [233]. Von einem Einfluss von Metoprolol auf IL-8 und IL-10 bei Diabetikern wurde noch nicht berichtet. Die Ergebnisse der RELATION Studie müssten also in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Die Apo-AI Konzentration war nach Bisoprolol-Gabe bei 47 Patienten mit essentieller Hypertonie leicht, aber nicht signifikant reduziert [234]. In einer weiteren Studie wurde kein Zusammenhang zwischen Bisoprolol und Apo-AI-Level berichtet [235]. In der RELATION Studie waren bei Patienten, die Bisoprolol einnahmen die Apo-AI-Konzentrationen signifikant reduziert. Eine vergleichbare Untersuchung bei Diabetes-Patienten gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht. Weitere Studien müssten diese Beobachtung aus der RELATION bestätigen, um zufällige Schwankungen auszuräumen.

Bei Patienten mit Gicht ist die IL-6 Konzentration sowohl im Serum als auch in den Gelenken signifikant erhöht, was den erhöhten IL-6 Level bei den RELATION Patienten, die Allopurinol einnehmen erklären kann [236-238].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass für die Schwankungen einiger Biomarker in der Literatur Hinweise existieren, die in der RELATION Studie bestätigt wurden. Einschränkend muss man hinzufügen, dass nicht untersucht wurde, wie sich die Einnahme mehrerer Medikamente gleichzeitig auf die Biomarkerkonzentrationen auswirkt. Bei insgesamt nur 114 Patienten werden die Gruppen für diese Art Untersuchung zu klein. Darüber hinaus müsste man Alter, Geschlecht und viele weitere Faktoren berücksichtigen um eine abschließende Aussage zu den Biomarkerkonzentrationen und den Begleitmedikamenten zu treffen. Das ist aber nur mit Hilfe sehr großer Studien oder Register möglich.

#### **4.3.4 Biomarker im Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen: Korrelation mit den Ergebnissen und der Injektionshäufigkeit**

Ein weiteres Ziel der RELATION war es herauszufinden, ob sich über die Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 eine Prognose für das Therapieansprechen voraussagen lässt. Es wurden dafür die standardisierten Retinadickenbestimmungen des Reading Centers für Foveal Center Point (FCP) und Central Subfield Mean Thickness (CSMT) verwendet. Darüber hinaus wurde betrachtet, ob die Biomarkerkonzentrationen an V1 mit den Visusänderungen an V6 und V14 korrelieren.

Es ergab sich in keiner der Gruppen eine eindeutige Korrelation. Einzig bei der Änderung der CSMT von Baseline zu Visite 6 und der IL-17A Konzentration gab es eine Korrelation sowohl in der Laser- als auch in der Kombinationsgruppe, wobei der Korrelationskoeffizient unter 0,5 lag. Womöglich kann man die IL-17A Konzentration an V1 benutzen um eine Prognose für die CSMT zu erhalten.

Eine höhere IL-17A Konzentration würde eine größere CSMT bedeuten. Die V1 Konzentration von IL-17A könnte also darauf hinweisen, dass man bei diesem Patienten häufiger injizieren muss, da die CSMT an Visite 6 noch nicht ausreichend reduziert war. Weiter standardisierte Messungen könnten helfen, diese Aussage zu verifizieren.

Der Quotient aus Injektionshäufigkeit und Visitenanzahl wurde als Hilfsparameter verwendet, um bei der abgebrochenen Studie ein unabhängiges Maß für die Behandlungsnotwendigkeit zu erhalten. Die Korrelation dieses Quotienten mit den Biomarkern an Visite 1 ergibt keine nennenswerten Effekte. Man kann also nicht vorhersagen, ob höhere oder niedrigere Konzentrationen bestimmter Biomarker bei Baseline auf eine höhere Notwendigkeit zur Behandlung hinweisen.

Die Untersuchungen haben also gezeigt, dass mit den in der Studie ausgewählten Biomarkern keine Rückschlüsse auf Therapieansprechen oder Behandlungshäufigkeit getroffen werden können. Lediglich IL-17A könnte ein möglicher Kandidat sein. Weitere Untersuchungen, vielleicht auch mit einem anderen Verfahren zur Bestimmung der Biomarkerkonzentration, könnten hier einen Aufschluss bringen.

Darüber hinaus weisen die Ergebnisse ebenfalls darauf hin, dass hohe systemische Biomarkerwerte am Anfang keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Somit lassen sich keine Prognosen auf die ophthalmologischen Ergebnisse anhand vorliegender Biomarker bei Baseline aufstellen. Möglicherweise liegt das daran, dass die Konzentrationen im Serum keinen unmittelbaren Effekt auf die Netzhaut haben. Unter Umständen dominieren die intraretinalen Geschehnisse bei DMÖ und PDR, so dass die Konzentrationen der im Serum gemessenen Biomarker keinen Einfluss auf die Krankheitsprogression in der Retina haben.

*Muether et al.* [239, 240] haben Kammerwasserproben von AMD und DMÖ Patienten entnommen, die eine Ranibizumab Injektion erhalten haben. Die Konzentration von VEGF wurde bestimmt und teilweise eine Korrelation zwischen der VEGF Konzentration und dem Outcome gefunden. In der RELATION Studie wurde bewusst mit Serumproben gearbeitet, da dies in der Praxis auch vom niedergelassenen Augenarzt, Hausarzt oder Diabetologen durchgeführt werden kann. Für Kammerwasserproben und Glaskörperproben ist ein operativer Eingriff nötig, der weit über den Aufwand einer Standarddiagnostik hinausgeht und bei einer multizentrischen Studie kaum standardisierbar ist. Tränenflüssigkeit hingegen ist vor allem bei älteren Patienten und Diabetikern, die eher zu trockenen Augen neigen nur in geringem Maße zu gewinnen und kleinste Reize wie Kälte, Luftzug oder künstliche Augentropfen verändern die Konzentrationen erheblich, so dass es sehr unrealistisch erscheint, standardisiert Tränenflüssigkeit an verschiedenen Zentren abzunehmen. In kleineren, vor allem bei monozentrischen Projekten wäre dies aber durchaus denkbar.

Ein weiterer Faktor, der eine Rolle bei der Qualität der RELATION Biomarker spielen könnte, ist das Handling der Proben am Zentrum (Aufarbeitung der Proben, Aliquotierung, zügiges Einfrieren) und die womöglich zu lange Lagerung dort. Es kann sein, dass die Proben nicht immer zügig verarbeitet und eingefroren wurden. Im ursprünglichen Prüfplan waren die Biomarker IL-6, MCP-1, sICAM-1 und sVCAM-1 festgelegt, für die die Lagerung am Zentrum bei 2 Monaten auf -20°C ausgereicht hätte. Erst nach Abbruch der Studie wurden die übrigen Biomarker dazu genommen, die womöglich der Lagerung für 2 Monate am Zentrum auf -20°C nicht standhalten. Darüber hinaus könnte es eine Rolle spielen, dass die Proben nicht immer alle 2 Monate verschickt wurden, sondern nach längeren Intervallen, worunter die Biomarkerkonzentration eventuell gelitten hat.

#### 4.4 Diskussion der Ergebnisse der Kollektivvergleiche

Zur Veranschaulichung der Diskussion sind die bereits in Kapitel 3.2.20 gezeigten Tabelle 86 und Tabelle 87 hier noch einmal einkopiert:

Biomarker	Signifikante Werte gegenüber gesunden Personen					
	DM ohne Komplikationen	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)	DM Nephrologie	Urtikaria	MS
IL-8	↑	↑	↑	↑	↑	↑
IL-10	↑	↑	↑	↑		↑
IL-17	na	↓	↓	↓		↑
MCP-1	↑	↑	↑	↑	↑	
VEGF	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Apo-A1	↓			↓		↓
Apo-A2	↓			↓		↓
Apo-B	↓			↓		↓
Apo-CII						↓
Apo-CIII				↑		↓
Apo-E						↓
sVCAM-1	↑	↑	↑	↑	↑	↑
sICAM-1	↑			↑	↑	↑
IL-6				↑		

Tabelle 86: Übersicht signifikant unterschiedlicher Biomarkerwerte im Vergleich zum Normalkollektiv mit ↑ für höhere Konzentration als Normalkollektiv und ↓ für niedrigere Konzentration als Normalkollektiv



Biomarker	Signifikante Werte gegenüber frühen Diabetikern			Signifikante Werte gegenüber Diabetikern mit Nephropathie	
	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)	DM Nephrologie	RELATION (DMÖ, n=291)	RELATION (DMÖ, V1, n=114)
IL-8	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10	↓	↓	↓	↓	↓
IL17	na	na	na	↓	
MCP-1	↓	↓		↓	↓
VEGF	↓	↓		↓	↓
Apo-A1				↑	
Apo-A2	↑			↑	↑
Apo-B	↑	↑		↑	↑
Apo-CII			↑		
Apo-CIII			↑	↓	
Apo-E					
sVCAM-1	↓	↓	↑	↓	↓
sICAM-1	↓	↓	↑	↓	↓
IL-6			↑	↓	↓

Tabelle 87: Übersicht signifikant unterschiedlicher Biomarkerwerte im Vergleich zu frühen Diabetikern bzw. Diabetikern mit Nephropathie mit ↑ für höhere Konzentration als Normkollektiv und ↓ für niedrigere Konzentration als frühe Diabetiker bzw. Diabetiker mit Nephropathie

Bei allen untersuchten Krankheitsgruppen sind die Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu gesunden Personen verändert. Auch bei den Apolipoproteinen und Adhäsionsmolekülen zeigen sich teilweise signifikant verschiedene Konzentrationen bei den Krankheitsgruppen im Vergleich zu gesunden Probanden.

IL-8, VEGF und sVCAM-1 sind bei allen 6 betrachteten Gruppen in Tabelle 86 im Serum erhöht. Auffällig ist außerdem das Profil der MS-Patienten, denn bis auf MCP-1 und IL-6 sind die Konzentrationen der Zytokine und Adhäsionsmoleküle signifikant höher im Vergleich zu gesunden Probanden. Wenn die Apolipoproteine verändert sind, dann liegen meist niedrigere Konzentrationen bei den Krankheitsgruppen vor, im Vergleich zu Gesunden. Die einzige Ausnahme bildet Apo-CIII, das bei Diabetikern mit Nierenbeteiligung signifikant höher ist, als bei gesunden Probanden.

**IL-8:** IL-8, auch als CXCL-8 bezeichnet, wird bei akuter und chronischer Entzündung induziert und aktiviert Neutrophile, Basophile, Granulozyten, und T-Lymphozyten [241-243]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bei den getesteten Gruppen eine erhöhte Serumkonzentration auftritt. Erhöhte IL-8 Werte wirken bei Patienten mit akutem Entzündungsgeschehen als Wegbereiter der Neutrophilen zum Entzündungsort [243]. Wie in Kapitel 4.3 schon erwähnt, ist IL-8 über die Bindung an den Rezeptor CXCR2 an der Angiogenese beteiligt [130, 131].

*Colobran et al.* [243] haben zusammengefasst, dass insbesondere ein IL-8 Polymorphismus (-251A/TI) im Zusammenhang mit diversen Pathologien steht (z.B. schwere akute Pankreatitis, Magenkarzinom, kolorektales Karzinom, Prostatakarzinom, Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, oder akute Pyelonephritis).

Im Krankheitsvergleich auffällig ist die niedrigere IL-8 Konzentration bei Patienten mit DMÖ oder Diabetischer Nephropathie im Vergleich zu frühen Diabetikern. Eine Vermutung könnte sein, dass bei den frühen Diabetikern akute Entzündungsgeschehen eher im Vordergrund stehen, als bei fortgeschrittenen Diabetikern (also solche mit z.B. DMÖ oder diabetische Nephropathie) und daher die IL-8 Serumkonzentration dann entsprechend erhöht ist.

Die erhöhte IL-8 Konzentration beeinflusst höchstwahrscheinlich die MMPs, wie in Kapitel 4.3 erwähnt. Die daraus folgende Veränderung der Extrazellulärmatrix ist ein Faktor in der Bildung von diabetischer Retinopathie, diabetischem Makulaödem und diabetischer Nephropathie [132, 179, 180].

Eine erhöhte Konzentration von IL-8 wird außerdem mit einer höheren Inzidenz für Typ 2 Diabetes in Verbindung gebracht [134].

Bei Multipler Sklerose spielt IL-8 eine Rolle beim Akquirieren von Immunzellen. Monozyten sezernieren IL-8 in hohen Mengen um andere Monozyten und mögliche polymorphonucleäre Neutrophile anzulocken. In der Zerebralflüssigkeit von MS Patienten ist IL-8 signifikant erhöht [244]. Das kann als Erklärung für die signifikant höhere Konzentration von IL-8 bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden dienen.

**IL-10:** IL-10 wird hauptsächlich von Monozyten, Macrophagen und B-Zellen gebildet, aber auch von T<sub>reg</sub>-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen, T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen [245-248] (als Übersichtsarbeit erläutert in [249]). Eine breite Palette von Genen wird durch IL-10 downreguliert. Darunter fallen unter anderem IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , sowie die NO-Produktion [247, 250-252]. Eine gute Übersicht zu den weiteren Effekten von IL-10 auf diverse Immunzellen bietet der Review von Trivella [135]. Interessant in Bezug auf die anderen in dieser Arbeit betrachteten Biomarker ist, dass auch die Bildung von IL-6, IL-8 (CXCL-2) und ICAM-1 durch IL-10 in bestimmten Zellen gehemmt wird [135, 253, 254]. Das könnte ein Grund dafür sein, warum bei den meisten hier gemessenen Kollektiven keine signifikante Änderung von IL-6 auftritt. IL-8 ist jedoch durchweg erhöht, ICAM-1 vereinzelt. Hier könnte IL-10 wieder eine Rolle spielen. ICAM-1 wird später in diesem Kapitel noch eingehender besprochen.

Aber nicht nur inhibitorische Wirkungen werden IL-10 zugeschrieben, sondern auch stimulatorische Wirkungen auf bestimmte Immunzellen wie zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen und Mastzellen. Darüber kommt es zur Hochregulation der MHC-Klasse-II-Moleküle und Steigerung der IgA Wirkung (Reviews [135] und [249]). Zusammenfassend ist IL-10 für die Inhibition und Regulation von sowohl akuten als auch chronischen Immunreaktionen verantwortlich.

Bisherige Untersuchungen mit Diabetikern weisen auf eine wichtige Rolle von IL-10 auf das Krankheitsgeschehen sowohl bei Typ 1 als auch Typ 2 Diabetikern hin. So haben *Exel et al.* in einer Studie gezeigt, dass Typ 2 Diabetiker mit sehr geringer Produktionsfähigkeit von IL-10 ein erhöhtes Risiko für Typ 2 Diabetes haben [255]. Exel vermutet, dass hohe IL-10 Konzentrationen Diabetes und ein metabolisches Syndrom verhindern können, da pro-Inflammatorische Zytokine gehemmt werden.

IL-10-Gabe verhinderte das Auftreten von Diabetes bei Mäusen [256]. Die Entwicklung geht mittlerweile so weit, dass Mäuse durch eine Art Impfung mit mehreren Komponenten – darunter auch IL-10 – eine verringerte Inzidenz für einen Typ-1 Diabetes entwickelten und weniger Hyperglykämie haben als Mäuse, die ohne IL-10 Komponente oder mit PBS (phosphat gepufferte Salzlösung) injiziert wurden [257].

In der Arbeit von *Lee et al.* wurde in einer monozentrischen Studie mit Typ 2 Diabetikern (46 mit DR und 28 ohne DR) gezeigt, dass eine erhöhte IL-10 Konzentration mit einem niedrigeren DR Risiko

einhergeht [136]. Das kann auch so in der Untersuchung der RELATION und der anderen Krankheitskollektive bestätigt werden. Auch wenn die IL-10 Konzentrationen fast aller Krankheitskollektive über dem Level der Gesunden liegen, so haben die frühen Diabetiker eine signifikant höhere IL-10 Konzentration als Patienten mit DMÖ oder diabetischer Nephropathie. Womöglich ist IL-10 gerade in den initialen Phasen des Diabetes aktiv und spielt später nur mehr eine untergeordnete Rolle.

Bei Untersuchungen mit zwei Genotypen von Urtikaria Patienten (Typ CU+ (chronic urticaria) beziehungsweise CU-, bezogen auf eine durch einen Parasiten ausgelöste Urtikaria) war die IL-10 Konzentration signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Probanden [258]. In der Untersuchung im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte jedoch kein Unterschied zwischen der IL-10 Konzentration bei den Patienten mit chronischer Urtikaria und den gesunden Probanden festgestellt werden. Weitere Untersuchungen zur Rolle von IL-10 bei Urtikaria erscheinen daher sinnvoll.

**IL-17:** IL-17A bindet an den IL-17 Rezeptor [184]. Je nach Zielstruktur bewirkt das proinflammatorische IL-17 die Expression von diversen Zytokinen wie Colony stimulating Factors (GM-CSF, G-CSF), Chemokinen (z.B. CXCL-1, CXCL-6, CXCL-8, CXCL-10), Metalloproteasen, IL-5, IL-6, Eosinophilen, ICAM-1, GCP-2, CINC, CCL-2 (MCP-1), TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , neutrophil elastase (NE) und Myeloperoxidasen (MPO), VEGF, PGE1, PGE2 (siehe Review: [138]).

Es ist nur sehr wenig bekannt über die Rolle von IL-17(A) bei Diabetikern. Bei Kindern mit Typ 1 Diabetes mellitus wurde gezeigt, dass die Th17-Immunkaskade hochreguliert ist [259]. Erhöhte Sekretion und Expression von IL-17 ging damit einher. Auch zirkulierende CD4-Zellen exprimieren unter anderem IL-17. IL-17 scheint eine starke Rolle bei der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus zu spielen.

Bei einem Diabetes Mausmodell, stellte man signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-17 im Serum fest [260]. Ausschlaggebend könnte dabei die RAAS Kaskade sein, da ein Sartan (AT1-Rezeptorblocker, dem Target von Angiotensin-II) die Konzentration von IL-17 verringern konnte. Es wird daher vermutet, dass IL-17 die Sensitivität der Zellen gegenüber Insulin verringern könnte.

Typ 2 Diabetiker haben eine höhere Anzahl von Th17-Zellen im Blut als nicht Diabetiker [261]. IL-17 wird bei Diabetikern vermehrt von den T-Zellen produziert [261]. Es wurde außerdem eine positive Korrelation zwischen HbA1c und IL-17 Konzentration gefunden. Diese Korrelation konnte in der RELATION Population für die Visite 1 Werte nicht bestätigt werden.

In einer weiteren Arbeit wurde bei jeweils 100 Typ 2 Diabetikern mit und ohne Nephropathie und gesunden Probanden im Serum die IL-17 Konzentration bestimmt [262]. Diabetiker ohne Nephropathie zeigten erhöhte IL-17A Konzentrationen, Patienten mit diabetischer Nephropathie hatten eine niedrigere IL-17A Konzentration als gesunde Personen. Das stimmt auch mit den Untersuchungen dieser Promotion überein. Leider liegen keine IL-17A Werte für Patienten mit frühem Diabetes mellitus in dieser Arbeit vor, aber die Konzentrationen von IL-17A sind auch bei den RELATION Patienten und den Patienten mit diabetischer Nephropathie signifikant reduziert.

Bei einigen Autoimmunerkrankungen wurde eine erhöhte Genexpression bzw. Serumkonzentration von IL-17A beobachtet. Darunter fallen z.B. entzündliche Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn [263], psoriatische Hautläsionen [264], Morbus Behcet mit aktiver Uveitis [265], rheumatoide Arthritis [266], Multiple Sklerose [267] und verschiedene Krebsarten [184].

Interessanterweise ist der Median von IL-17 aller Urtikaria Patienten, die als Vergleichskollektiv zu den RELATION Patienten in dieser Arbeit vermessen wurden, unverändert gegenüber gesunden

Personen. Im Gegensatz dazu haben *Daschner et al.* [258] sowohl bei CU+ als auch CU- Patienten niedrigere Konzentrationen von IL-17 gefunden im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Urtikaria.

Bei Patienten mit optikospinaler MS war die Konzentration von IL-17 in der Zerebralflüssigkeit im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht [244]. In der Arbeit von Lock wurde außerdem berichtet, dass die IL-17 Gentranskription bei den Läsionen der MS-Patienten hochreguliert ist [268].

IL-17 beeinflusst die Rekrutierung von Neutrophilen indem IL-8 freigesetzt wird [269]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass diese beiden Biomarker bei MS-Patienten auch im untersuchten Kollektiv dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.3) erhöht sind.

**MCP-1 (CCL2):** MCP-1 führt zur Proliferation von Monozyten, aktivierten T-Zellen und NK-Zellen [143]. Die Bindung von MCP-1 an den CCR2 Rezeptor auf Endothelzellen führt in-vitro zu Chemotaxis und Bildung von Blutgefäßvorstufen (Tubes) [270], in vivo kommt es zur Angiogenese [131].

Besonders ein Polymorphismus des MCP-1 wurde mit diversen Krankheiten in Verbindung gebracht. Das -2518G Allel steht im Verdacht zu vermehrter MCP-1 Produktion zu führen z.B. bei systemischer Sklerose, Asthma, systemischem Lupus erythematodes, Juveniler rheumatoider Arthritis, Koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt, Morbus Alzheimer, Major Depression, Typ 1 Diabetes, Typ 2 Diabetes, HIV-1 Infektion und Lungentuberkulose. Jedoch konnten nicht für alle diese Krankheiten/Infektionen der endgültige Zusammenhang bestätigt werden [243].

MCP-1 induziert Matrix Metalloproteasen vom Membrantyp auf der Oberfläche von Endothelzellen. Diese Induktion könnte ein Grund dafür sein, dass die Endothelzellfunktion und damit die Permeabilität der Gefäße beeinträchtigt wird [7].

Endothelzellen produzieren MCP-1, wodurch Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten aktiviert werden [142, 143]. Die Adhäsion von Leukozyten ist einer der entscheidenden Schritte in der Pathogenese der diabetischen Retinopathie und DMÖ (s. VCAM-1 und ICAM-1). Damit kann begründet werden, warum die Serum-Konzentration von MCP-1 der DMÖ Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten erhöht ist.

MCP-1 induziert die Ausschüttung von IL-6 und ICAM-1 aus tubulären Endothelzellen [271]. Das könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Konzentration von MCP-1 im Kollektiv der Nephrologiepatienten (s. Kapitel 3.3.4) am höchsten ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten Krankheiten. Außerdem kann damit erklärt werden, warum die Diabetiker mit Nephropathie erhöhte ICAM-1 Werte aufweisen und die einzige Patientengruppe mit signifikant erhöhten IL-6 Serumkonzentrationen ist.

Die schon beschriebene MCP-1 Konzentrationsänderung bei MS-Patienten [243] konnte auch die Gruppe von Ishizu [244] bestätigen, die eine signifikant niedrigere Konzentration von MCP-1 bei MS-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gemessen hat. In dieser Arbeit konnte das nicht bestätigt werden (s. Kapitel 3.3.4). Die Konzentrationen von MCP-1 unterschieden sich zwischen MS Patienten und Gesunden nicht.

**VEGF:** Die Konzentration von VEGF wird durch viele Parameter beeinflusst (cAMP, Steroide, PKC-Inhibitoren, Wachstumsfaktoren, freie Radikale und Glukose) aber am stärksten durch Ischämie [272, 273]. Im Auge wird VEGF bei Sauerstoffmangel von RPE-Zellen, Ganglienzellen, Müllerzellen, Perizyten, Endothelzellen, Gliazellen, Neuronen und glatten Muskelzellen der Retina gebildet [7, 274, 275], wobei Müllerzellen und Gefäßendothelzellen die Hauptproduzenten darstellen. Es gibt Hinweise

darauf, dass eine negative Korrelation zwischen Glucosekonzentration und VEGF Freisetzung gibt (Glucose-Entzug führt zu vermehrter VEGF-Expression) [276].

Die Gruppe um Funatsu [144] hat im Glaskörper von Patienten mit DMÖ stark erhöhte Konzentrationen von VEGF, ICAM-1, IL-6 und MCP-1 gefunden. Diese waren signifikant höher als bei Patienten ohne Diabetes und Diabetikern ohne DR. Auch die DMÖ Patienten der RELATION Gruppe wiesen eine erhöhte Serumkonzentration von VEGF im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Jedoch lagen bei frühen Diabetikern und Diabetikern mit Nephropathie signifikant höhere VEGF-Serumkonzentrationen vor, als bei den DMÖ Patienten der RELATION Studie.

Einen Unterschied in der VEGF Konzentration von Diabetikern im Vergleich zu Gesunden konnte die Gruppe um Ozturk [137] zeigen. Sie berichtete, dass die Serumkonzentration von VEGF von gesunden Probanden signifikant niedriger ist als bei Diabetikern ohne DR und bei Diabetikern mit DR. Das sind zwei Ergebnisse, die in der RELATION bestätigt werden können. Jedoch war in der Arbeit von Ozturk die VEGF Konzentration von Diabetikern ohne DR niedriger als bei Diabetikern mit DR.

Die frühen Diabetiker, die in dieser Arbeit als Vergleich zu den RELATION Patienten untersucht wurden, weisen eine Limitationen auf: der Status der Retina wurde nicht erfasst. Es könnte also durchaus sein, dass unter diesen frühen Diabetikern schon Patienten sind, die eine DR oder ein DMÖ aufweisen. Außerdem muss man auf die unterschiedliche Qualität der Proben hinweisen. Die Proben von den Vergleichskollektiven wurden alle monozentrisch und unter standardisierten Bedingungen abgenommen. Dadurch kommt es nur selten zu Verzögerungen beim Aufbereiten und Aliquotieren der Proben. Die Proben wurden darüber hinaus sofort nach der Aliquotierung bei -80° eingefroren.

Bei den Proben in der RELATION Studie kann man nicht davon ausgehen, dass der vorgegebene Prozess von Aliquotieren und sofortigem Einfrieren immer eingehalten wurde. Das könnte möglicherweise ein Grund dafür sein, dass die Konzentrationen der RELATION-Proben immer wieder niedriger ausfallen als die der Vergleichskollektive, vor allem im Vergleich zu den Proben der frühen Diabetiker und der Diabetiker mit Nephropathie.

Ein weiterer möglicher Faktor, der für die niedrige systemische Konzentration von VEGF und auch der anderen Entzündungsmediatoren im Vergleich zu den frühen Diabetikern und den Diabetikern mit Nierenbeteiligung eine Rolle spielen könnte, ist die Wahl der Ein- und Ausschlusskriterien der RELATION Studie. Denn es durften nur relativ gesunde Diabetiker in die Studie randomisiert werden, nämlich solche mit einem HbA1c unter 10 %, mit stabiler Diabetestherapie und Blutdruck und Patienten ohne fortgeschrittene Nephropathie.

In einer Arbeit mit Nephropathiepatienten war gegenüber Gesunden die VEGF Konzentration im Urin erhöht [277]. Im Plasma konnte jedoch keine Konzentrationsänderung festgestellt werden [277].

Im Gegensatz dazu zeigten die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen, dass die Serum VEGF Konzentrationen von Patienten aus der Nephrologie signifikant höher waren, als die gesunder Probanden (s. Kapitel 3.3.5). Es gab keinen Unterschied in der VEGF Konzentration bei Patienten mit frühem Diabetes im Vergleich zu den Nephropathie Patienten. Die VEGF Konzentration bei den DMÖ Patienten war jedoch geringer, was an den oben genannten Limitationen der RELATION Proben liegen könnte.

**Apolipoproteine:** Apolipoproteine sind zuständig für den korrekten Aufbau der Lipoproteine, den Zusammenhalt der Partikel während der Zirkulation und der zielgerichteten Wirkung am Bestimmungsort [199].

Apo-E trägt zur Stabilisierung und Metabolisierung von Lipoproteinen bei und bindet mit hoher Affinität an den entsprechenden Rezeptor (E-Rezeptor: Apo B,E LDL Rezeptor) [278]. Bindet Apo-E als Teil des LDL an den Rezeptor, werden dadurch die zelluläre Aufnahme des Lipoproteins und die intrazelluläre Metabolisierung vermittelt, wodurch Cholesterin intrazellulär zur Verfügung steht [279].

Pathologische Auswirkungen haben Änderungen der Apolipoproteine, wenn der Metabolismus gestört ist oder genetisch bedingt ein Überangebot vorliegt. Einlagerung von Cholesterin in Arterienwänden kann eine der Folgen sein [199].

Patienten mit Metabolischem Syndrom und koronarer Herzerkrankung (KHK) haben eine signifikant höhere Konzentration an Apo-C3 als Patienten mit Metabolischem Syndrom ohne KHK [280]. In einer Arbeit aus dem Jahr 2005 wurde gezeigt, dass Typ 2 Diabetiker ein erhöhtes Verhältnis von Apo-C2/Apo-C3 und Apo C3/Apo E im Plasma [281] aufweisen. Trotz der höheren Plasma Apo-C3 Konzentrationen waren in den Triglycerid-reichen Lipoproteinen relativ wenig Apo-C3 Moleküle vorhanden, was auf eine Störung des Apo-C3 Metabolismus bei Diabetes mellitus hindeutet.

In den Untersuchungen dieser Doktorarbeit war die Apo-C3 Konzentration bei Patienten mit diabetischer Nephropathie erhöht, was durch die Störung der Apo-C3 Metabolismus erklärt werden kann.

Eine Japanische Gruppe hat herausgefunden, dass bei Patienten mit diabetischer Retinopathie die Apo-A1 Konzentration niedriger ist im Vergleich zu Patienten ohne DR [147]. Die Apo-B Konzentration war jedoch erhöht im Vergleich zu Patienten ohne DR [147]. Das konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (s. Kapitel 3.2.16.1 und 3.2.16.2), wobei in der japanischen Arbeit nicht auf DMÖ eingegangen wurde. Die Konzentration von Apo-A2 und Apo-B war bei DMÖ Patienten der RELATION Studie erhöht im Vergleich zu frühen Diabetikern und Diabetikern mit Nephropathie. Aber gegenüber gesunden Probanden war die Konzentration von Apo-A1 und Apo-A2 und Apo-B verringert. Genau diese 3 Apolipoproteine waren auch bei Diabetikern mit Nephropathie gegenüber gesunden Personen reduziert.

Sehr auffällig ist, dass in dieser Arbeit bei MS Patienten alle Apolipoprotein-Konzentrationen verringert sind. Eine essenzielle Rolle bei MS spielt ein Allel des Apo-E Gens [282]. Es wurde außerdem ein Zusammenhang von MS mit einem Apo-C2 Gen beschrieben [283]. Ein Apo-A1 Promotor Polymorphismus wurde außerdem mit der kognitiven Leistungsfähigkeit von MS Patienten in Verbindung gebracht [284]. *Sladkova et al.* [285] haben eine Reihe von Biomarkern, darunter Apo-A1 und Apo-B untersucht. Es wurde aber kein Unterschied zwischen den beiden Stadien RRMS (relapsing remitting MS) und CIS (clinical isolated syndrome) gefunden.

Somit könnten die Untersuchungen, die in Kapitel 3.3.15 beschrieben wurden, erste Hinweise darauf sein, wie sich das ganze Spektrum der Apolipoproteine bei neudiagnostizierten MS Patienten verhält.

Eine Einschränkung könnte es für diese Ergebnisse bei MS Patienten geben. Da es sehr auffällig ist, dass alle Apolipoproteine verringert sind, könnte es sein, dass das Luminex Kit zu niedrige Werte erzeugt hat. Systematische Messfehler könnten der Grund dafür sein. Daher sollten in Folgeuntersuchungen die Ergebnisse zu den Apolipoproteinen aus Kapitel 3.3.15 bestätigt werden.

**sVCAM-1:** Verglichen mit gesunden Personen ist die sVCAM-1 Konzentration im Serum aller Patienten signifikant erhöht. Vor allem bei frühen Diabetikern und Diabetikern mit Nephropathie ist die Konzentration deutlich höher als bei den anderen Kollektiven. Vergleicht man die Diabetes-Gruppen untereinander, fallen besonders die Nephropathie Patienten auf. *Koga et al.* haben bei 95 Japanern mit Typ 2 Diabetes mellitus herausgefunden, dass die Serumkonzentration von sVCAM-1

mit dem Schweregrad der diabetischen Nephropathie [157] zusammenhängt. Die Gruppe führt das auf die endotheliale Dysfunktion im ganzen Körper und vor allem in den Nierengefäßen zurück. Generell wurden bei Typ 1 Diabetikern im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Serumkonzentration von sVCAM-1 (und sICAM-1) gefunden [158].

Wie in Kapitel 4.3 bereits erwähnt, spielt VCAM-1 eine wichtige Rolle bei der Anheftung von Immunzellen an Endothelzellen [202]. sVCAM-1 wird unter anderem nach Induktion mit TNF- $\alpha$ , IL-1 [152] und Lipopolysaccharide exprimiert. Auch AGEs bewirken eine vermehrte Bildung von VCAM-1 [155]. Dadurch kann erklärt werden, warum schon frühe Diabetiker eine erhöhte sVCAM-1 Konzentration im Serum aufweisen.

Bei 19 Patienten mit PDR waren sowohl die Serum-Konzentration von VCAM-1 (und ICAM-1) als auch die Glaskörper Konzentration beider Adhäsionsmoleküle signifikant erhöht im Vergleich zu den Konzentrationen von 15 Kontrollpatienten ohne Diabetes. Darüber hinaus wurde bei immunhistologischen Untersuchungen der Konjunktiva von Diabetikern mit und ohne diabetischer Retinopathie festgestellt, dass die Konzentration von sVCAM-1 (und sICAM-1) signifikant erhöht ist [286]. Ein ähnlicher Trend zeigt sich auch in den Serumkonzentrationen von sVCAM-1 in den Untersuchungen dieser Arbeit (s. Kapitel 3.3.12). Die Konzentrationen bei den Diabetikern, MS- und Urtikaria-Patienten sind im Gegensatz zu Gesunden signifikant erhöht.

**ICAM-1:** ICAM-1 kommt unter anderem auf Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen vor [287]. Die Expression von ICAM-1 wird von Zytokinen gesteuert [203] und die Konzentration von zirkulierendem ICAM ist nach Gabe von Glucose erhöht [288].

Wie in gängigen Lehrbüchern beschrieben, spielt ICAM-1 bei der Anheftung der Leukozyten eine wichtige Rolle. Es führt neben E-Selektin zur lockeren Anheftung der Granulozyten, die in Folge verstärkt wird, wonach Granulozyten zwischen den Lücken der Endothelzellen in entzündetes Gewebe einwandern können. Im Gewebe werden andere Makrophagen durch Ausschüttung von Mediatoren (z.B. Interleukine, chemotaktische Substanzen C5a und C3a des Komplementsystems, Leukotriene) angelockt.

In den choroidalen Gefäßen von Diabetikern findet man eine erhöhte Zahl von Leukozyten, die mit einer Ausstülpung (drop-out) oder einer Degeneration der Choriokapillaris einhergehen [289]. Außerdem hängt die Leukozytenanheftung mit der Minderperfusion der Gefäße zusammen [289], scheint aber nicht der Grund für die Minderperfusion.

Bei diabetischen Ratten wurde eine erhöhte Anzahl aktivierter Monozyten beobachtet [290]. Die Monozyten verschließen zusammen mit Granulozyten zeitabhängig immer mehr Gefäße und in der Folge kommt es zur Zerstörung des Kapillarbett [290]. Monozyten und Makrophagen wurden vermehrt dort gefunden, wo es zum Verlust von Kapillaren und zur Neovaskularisation kommt [290].

Die Rolle von ICAM-1 bei der Schädigung retinaler Gefäße wurde bei ICAM-1 Knock-Out Mäusen untersucht. Diese hatten nach Induktion von Diabetes beträchtlich weniger Endothelschäden und mehr intakte Perizyten als Wildtyp Mäuse, bei denen Diabetes induziert wurde [291].

Die ICAM-1 Ausschüttung wird durch retinal produziertes VEGF verstärkt [272]. Dadurch kann man die negativen Effekte von VEGF auf die Integrität der Zellwand erklären. Bei Kindern mit unzureichend therapiertem oder therapieresistentem Typ 1 Diabetes war die sICAM-1 Konzentration im Serum erhöht [160]. *Nowak et al.* haben in ihren Untersuchungen herausgefunden, dass eine signifikant höhere sICAM Konzentration bei Diabetes mellitus Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden vorliegt [156]. Das kann in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Kapitel 3.3.13). Die

Gruppe der frühen Diabetiker und auch die Diabetiker mit Nephropathie haben eine signifikant erhöhte Konzentration von sICAM-1 im Vergleich zu Gesunden.

**IL-6:** Es ist etwas verwunderlich, dass es keinen Unterschied der IL-6 Konzentration zwischen Gesunden und erkrankten Personen gibt (siehe Kapitel 3.3.14), denn bei fast allen chronisch-entzündlichen Erkrankungen ist die IL-6 Konzentration im Serum erhöht [292]. Insulinresistente und adipöse Personen weisen eine höhere Plasma-IL-6 Konzentration auf als gesunde, insulinsensitive Patienten [293].

Hypoxie induziert die Bildung von IL-6 [161], was die Expression von IL-6 bei der Entstehung und Progression der DR und der diabetischen Nephropathie erklärt. *Cohen et al.* haben gezeigt, dass IL-6 die VEGF-Bildung steigert [162], das bekanntlich für die Neovaskularisation und Permeabilität von Gefäßen in der Netzhaut verantwortlich ist.

Bei intraokularen Untersuchungen war die IL-6 Konzentration bei DR Patienten signifikant höher als bei nicht Diabetikern [294] und bei DMÖ Patienten sogar noch einmal um ein vielfaches erhöht [144], was sich aber in der Plasmakonzentration nicht widerspiegelte. In Tränenflüssigkeit hat die Gruppe um Oh [295] eine Korrelation zwischen der IL-6 Konzentration und der CRT gefunden.

Die Gruppe von *Lee et al.* zeigte in einer monozentrischen Studie bei Typ 2 Diabetikern mit 46 DR und 28 nicht-DR Patienten, signifikante Unterschiede der IL-6 und IL-8 Serumkonzentrationen zwischen verschiedenen Retinopathie Stadien [136].

Von einer signifikant höheren IL-6 Konzentration wurde bei Urtikaria Patienten vom CU-Typ im Vergleich zu Gesunden berichtet [258]. Das konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, wobei eine Tendenz zu höheren IL-6 Konzentrationen bei Urtikaria Patienten im Vergleich zu Gesunden vorhanden war.

Bei MS-Patienten ist die IL-6 Expression in Hirn-Läsionen hochreguliert [268]. In den Serumuntersuchungen, die in dieser Arbeit betrachtet wurden, gab es keine erhöhte IL-6 Konzentration (siehe Kapitel 3.3.14). Die IL-6 Serumkonzentrationen der MS Patienten waren vergleichbar mit den IL-6 Konzentrationen gesunder Probanden. Daher sollten weitere Untersuchungen die Änderung der IL-6-Konzentration untersuchen.



## 5 Gesamtzusammenfassung

Die RELATION Studie wurde konzipiert um zu beweisen, dass bei Patienten mit Visusbeeinträchtigung auf Grund eines DMÖ die Kombinationstherapie von Ranibizumab und Laser Photokoagulation der alleinigen Lasertherapie überlegen ist. Als primärer Endpunkt wurde dafür die Visusänderung zwischen Baseline und der letzten Visite herangezogen. Die Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der Lasertherapie konnte bewiesen werden. Der Visusgewinn von 6,4 vs. 2,0 Buchstaben ( $p=0,01$ ) mit 76 Patienten im Kombinationsarm und 38 Patienten im Laserarm war signifikant. Neben dem Visusgewinn über die Zeit wurde in der RELATION Studie auch gezeigt, dass an höherer Anteil an Patienten mit der Kombinationstherapie 15 Buchstaben gewinnen (15,8 % vs. 5,3 %,  $p=0,108$ ) bzw. die 73-Buchstaben Grenze überschritten (40,8 % vs. 28,9 %,  $p=0,219$ ) als mit der Laser Monotherapie. Auch hinsichtlich der Abnahme der Retinadicke konnte die Kombinationstherapie einen stärkeren Effekt erzielen (105  $\mu\text{m}$  vs. 78,95  $\mu\text{m}$ ,  $p=0,503$ ). Patienten mit einem fokalen Makulaödem hatten den stärksten Visusgewinn mit 12,55 Buchstaben in der Kombinationsgruppe im Gegensatz zu Patienten mit intermediärem (6,57 Buchstaben) oder diffusem Ödem (4,18 Buchstaben). In der Lasergruppe gewannen Patienten mit fokalem Ödem lediglich 0,67, mit intermediärem 2,63 und mit diffusem Ödem 1,40 Buchstaben hinzu. Die ANCOVA Analyse des primären Endpunkts zeigt, dass der Visus bei Baseline, der DMÖ-Typ und die Therapie einen signifikanten Einfluss auf das Visusergebnis hatten. In der RELATION Studie wurde auch eine Subgruppe von 23 Patienten mit zusätzlicher proliferativer diabetischer Retinopathie untersucht. Das Vorhandensein einer PDR hatte keinen Einfluss auf den primären Endpunkt. Patienten mit PDR gewannen im Kombi-Arm lediglich 3,22 ( $n=18$ ), im Laserarm 3,20 ( $n=5$ ) Buchstaben. Es gab einige sicherheitsrelevante Ereignisse, wobei kein Ereignis in einer der Gruppen signifikant erhöht war. Es gab keinen Gruppenunterschied bezüglich Sicherheit bei den PDR Patienten. Es traten keine neuen unerwünschten Ereignisse im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten und der Fachinformation von Ranibizumab auf.

Die RELATION Studie wurde auf Grund der Zulassung von Ranibizumab in der Studienindikation DMÖ vorzeitig abgebrochen. Die Zulassung wurde auf Grund positiver Ergebnisse von klinischen Prüfungen ausgesprochen, die bei der Konzipierung der RELATION Studie noch nicht vorlagen. Die Zulassungsstudien zeigten eine klare Überlegenheit von Ranibizumab gegenüber Laser. Daher wurde das Fortführen der Studie mit einem Laser-Monoarm als nicht mehr ethisch vertretbar eingeschätzt und die Studie vorzeitig beendet. In Folge liegen Ergebnisse von 128 Patienten vor. In dieser Arbeit wurden gezielt die 114 Patienten betrachtet, von denen Serumproben vorhanden waren. Zu beachten ist, dass die 114 Patienten nicht zu einem einheitlichen Punkt die Studie beendeten, sondern zwischen Visite 3 und 11 die letzte Untersuchung hatten. Der letzte gemessene Wert wurde für jede darauffolgende Visite bis Visite 14 übernommen (LOCF – last observation carried forward Methode).

Die Gesamtpublikation wird gerade erstellt.

Die in der RELATION erhobenen Biomarker wurden untersucht um festzustellen, ob die Therapie einen Einfluss auf die Biomarker hat und um mögliche prognostische Faktoren für Baseline-Charakteristika oder das Outcome zu finden.

Die Biomarker veränderten sich teilweise über den Studienzeitraum, jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar, ob das unter Einfluss der Therapie stattfand. Weitere Untersuchungen sind dafür nötig. Besonders die Reduktion der IL-17 Werte im Kombinationsarm ist auffällig und sollte noch einmal betrachtet werden. Hier bietet sich unter Umständen eine Änderung der Methode an, da die Konzentration oft unter der Nachweisgrenze lag.

Ein Zusammenhang zwischen den anatomischen Parametern der Patienten und den Biomarkerkonzentrationen bei Baseline konnte nicht festgestellt werden. Eine höhere oder niedrigere Biomarkerkonzentration im Serum hatte keinen Einfluss auf die Krankheitsprogression. Das lokale Entzündungsgeschehen scheint im Vordergrund zu stehen. Eventuell waren darüber hinaus die Fallzahl und der Beobachtungszeitraum zu gering, um einen signifikanten Einfluss festzustellen.

Bei Betrachtung der Begleitmedikamente wurden einige signifikante Änderungen von Biomarkerkonzentrationen festgestellt. Jedoch ist die Fallzahl in der RELATION-Studie nicht groß genug um endgültige Aussagen treffen zu können.

Neben den Serumproben aus der RELATION wurden außerdem gesunde Probanden, Patienten mit frühem Diabetes, Patienten mit diabetischer Nephropathie, Urtikaria und MS-Patienten untersucht.

Die Untersuchung der Kollektive zeigte bei einer Reihe von Biomarkern bei frühen Diabetikern eine signifikante Erhöhung (IL-8, IL-10, MCP-1, VEGF, sVCAM-1 und sICAM-1) oder eine signifikante Reduktion (Apolipoproteine AI, AII, und B) der Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden. Viele Zytokine sind bei der Gruppe der frühen Diabetiker signifikant höher als bei fortgeschrittenen Diabetikern mit DMÖ oder diabetischer Nephropathie. Patienten mit diabetischer Nephropathie weisen wiederum höhere Werte auf als DMÖ Patienten. Auch bei Urtikaria und MS Patienten sind viele Entzündungsfaktoren im Vergleich zu gesunden Personen erhöht. Diese Erkenntnisse können womöglich für das Screening nach Diabetes mellitus, Urtikaria oder MS benutzt werden.

## 6 Fazit

Die RELATION Studie beweist im vorliegenden Studienzeitraum und für die gewählte Patientenpopulation die Wirksamkeit und Sicherheit einer kombinierten Therapie von Ranibizumab und Laserphotokoagulation. Die Ergebnisse der RELATION Studie unterstützen damit die mittlerweile veröffentlichten Studienergebnisse größerer Studien und Zulassungsstudien.

Die Subgruppe der PDR Patienten muss in weiteren Studien untersucht werden, da die Ergebnisse in dieser Studie wegen der geringen Fallzahl und dem frühen Studienende nicht eindeutig waren.

Die Serumkonzentrationen, die in der RELATION Studie untersucht wurden, konnten keine Hinweise auf Progression oder Krankheitsansprechen liefern. Das ist möglicherweise nur mit lokal am Auge gewonnenen Proben möglich. Eventuell war die Patientenzahl zu limitiert, um Korrelationen zu zeigen. Womöglich liegt die fehlende Korrelation aber auch an der Auswahl der Biomarker. Es gab darüber hinaus keine Hinweise darauf, dass die Therapien der RELATION Studie systemisch Biomarkerkonzentrationen beeinflusst.

Der Biomarkervergleich zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen liefert womöglich Hinweise auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus. Wenn prospektiven Studien mit gesicherter Qualität der Blutproben diese Signifikanzen bestätigen, könnte man das für das Monitoring und die Behandlung der Patienten nutzen: findet man Serum oder Plasmabiomarker, die Ansteigen, sobald eine DR oder ein DMÖ vorliegt, kann zielgerichteter zum Augenarzt überweisen. Somit würden Ressourcen gezielt genutzt und unnötige Untersuchungen vermieden werden.

Die veränderten Werte der frühen Diabetiker im Vergleich zu den diabetischen Nephropathie-Patienten könnten auch bei Screenings helfen, so dass die Überweisung des Patienten vom Hausarzt zum Nephrologen zielgerichteter laufen kann. Die entsprechenden Bluttests könnten über die Quartalsbesuche beim Hausarzt bzw. Diabetologischen Schwerpunktpraxen angeboten werden.

Eine prospektive Studie, die sowohl gesunde als auch erkrankte Patienten parallel untersucht, würde die Aussagekraft dieser Ergebnisse unterstützen. So könnte bestätigt werden, dass die Erhöhung oder Verringerung der Serumkonzentration bestimmter Biomarker mit der Krankheitsentwicklung z.B. eines Diabetes mellitus einhergeht. Auch die Progression zu einem DMÖ oder zu einer diabetischen Nephropathie könnte abgeleitet werden. Schwierig ist bei solchen Untersuchungen immer die Blutproben zeitnah zu verarbeiten, zu aliquotieren und schnell auf möglichst niedriger Temperatur einzufrieren. Ein sofortiger Transport zu einem zentralen Labor ist oft aus kostentechnischen und logistischen Gründen schwer realisierbar, sobald mehrere Zentren beteiligt sind.

Es bleibt zu hoffen, dass in Zukunft solche Projekte finanzierbar sind oder in großen Registerstudien diese Problemstellung aus vorhandenen Blutproben untersucht werden können.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ADA	American Diabetes Association
AE	Adverse Event: unerwünschtes Ereignis
AGE	Advanced glycation endproduct
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ANOVA	Analysis of variance
ANCOVA	Analysis of covariance
AP	Alkalische Phosphatase
Apo	Apolipoprotein
AT	Angiotensin
BCVA	Best corrected Visual acuity (bestkorrigierter Visus)
BMI	Body mass index
CD	cluster of differentiation
CG	Cannot grade
CI	Konfidenzintervall
CIS	clinical isolated syndrome
CRF	Case report Form (Fragebogen)
CRT	Zentrale Retinadicke (central retinal thickness)
CSF	Colony stimulating factors
CSMT	Central Subfield Mean Thickness
CU	Chronische Urtikaria
CXCL	Chemokine (C-X-C-motif) ligand
CXCR	Chemokin Rezeptoren mit C-X-C motif
DAG	Diacylglycerol
DM	Diabetes mellitus
DMÖ	Diabetisches Makulaödem
DR	Diabetische Retinopathie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EP	Endpunkt
EQ-5D	EuroQol Frageböge mit fünf items
ERK	Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase
ETDRS	Early treatment diabetic retinopathy study
Fab	Fragment antigen binding
FAS	Full analysis set
FCP	Foveal Center Point
FGF	Fibroblast growth factor
FLA	Fluoreszenzangiographie
Flk	Fetal liver Kinase
Flt	Fms-like Tyrosinekinase
FP	Fundus Photographie
FU	Follow Up
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCP	Good clinical practice
GCP	Granulocyte chemotactic peptide
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
GOT	Glutamat-oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamatpyruvat-Transaminase
HbA1c	Glykohämoglobin
HDL	High density lipoprotein
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$ (hypoxia induced factor-1 $\alpha$ )

HS	High sensitive
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILGF	Insulin like growth factor
ILM	Inner limiting membrane: innere Grenzmembran
Inj.	Injektion
IOP	Intraocular pressure
IRMA	Intraretinale mikrovaskuläre Anomalien
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
$K_d$	Dissoziationskonstante
KDR	kinase insert domain Rezeptor, VEGFR-2
KK	Korrelationskoeffizient
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LKP	Leiter der klinischen Prüfung
LOCF	Last observation carried forward
LPL	Lipoproteinlipase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NEI	National eye institute
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
NPDR	Nichtproliferative diabetische Retinopathie
NVD	Neovaskularisation der Papille
NVE	Neovaskularisation außerhalb der Papille
OCT	Optical Coherence Tomography
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDR	Proliferative diabetische Retinopathie
PGE	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PlGF	Placental growth factor
PPS	Per protocol set
PRN	Pro re nata = bei Bedarf
Prim.	primär
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
R	Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
RAS	Ratten-Sarkomvirus
RC	Reading Center
ROS	Reactive Oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
RRMS	relapsing remitting MS
RS	Randomized Set
SAE	Serious adverse event, schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis

SCN	Screening
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SD OCT	Spectral Domain-OCT
SHC	Src (sarcoma) homology and collagen homology
SLD	Superlumineszenzdiode
StoC	Standard of Care
(s)ICAM	(Soluble) intercellular adhesion molecule
(s)VCAM	(Soluble) vascular cell adhesion molecule
T1, T2	Typ 1, Typ 2
TD OCT	Time domain OCT
TGF	Transforming growth factor
TH (Zelle)	T-Helfer(zellen)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE-cadherin	Vascular Endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF Rezeptoren
VFQ-25	Visual function questionnaire (25 items)
V/Vis	Visite
VI	Visual impairment, Visusbeeinträchtigung
VLA	Very late antigen
VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization

## 8 Anhang

### 8.1 Ein- und Ausschlusskriterien

#### 8.1.1 Einschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien mussten für eine Randomisierung in die RELATION Studie erfüllt sein:

- Männer und Frauen  $\geq 18$  Jahre nach erfolgter schriftlicher Einverständniserklärung
- Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 (nach ADA oder WHO Kriterien) mit einem HbA1c nicht größer als 10 % bei Visite 1. Patienten sollten diätetisch, mit Bewegungsübungen und / oder pharmakologisch hinsichtlich ihres Diabetes behandelt werden
- Patienten mit Visusverschlechterung auf Grund eines fokalen oder diffusen diabetischen Makulaödems auf mindestens einem Auge, das nach Ansicht des Studienarztes für eine Lasertherapie geeignet war. Für den Fall, dass beide Augen geeignet waren, wurde das Auge mit dem schlechteren Visus, gemessen an Visite 1, für die klinische Prüfung ausgewählt. Es sei denn der Prüfungsarzt entschied aus medizinischen Gründen, dass das andere Auge besser für die Studienbehandlung geeignet wäre. Das Studienauge musste zu Visite 1 folgende Kriterien erfüllen:
  - Die bestmöglich korrigierte Sehschärfe (BCVA) lag zwischen 78 und 39 Buchstaben, gemessen mittels ETDRS Tafeln bei 4 Metern Testabstand (Snellenäquivalent  $\sim 20/32$  bis  $\sim 20/160$ )
  - Der Visusverlust war durch ein diabetisches Makulaödem bedingt und hat nach Einschätzung des Studienarztes keine erkennbaren anderen Ursachen

- Die medikamentöse Behandlung des Diabetes mellitus war während der letzten 3 Monate vor Randomisierung stabil und es war zu erwarten, dass die Behandlung über die gesamte Studiendauer stabil bleibt

### **8.1.2 Ausschlusskriterien**

Patienten durften nicht in die RELATION Studie randomisiert werden wenn folgende Kriterien zutrafen:

#### **Begleiterkrankungen des Auges**

- Begleiterkrankungen des Studienauges, welche nach Ansicht des Studienarztes eine Verbesserung des Visus durch die Studienbehandlung verhindern konnten
- Aktive intraokulare Entzündung (Grad *trace* oder höher) in einem Auge
- Jede aktive Infektion sowie jeder Verdacht auf eine aktive Infektion in einem Auge (z.B. Konjunktivitis, Keratitis, Skleritis, Uveitis, Endophthalmitis)
- Uveitis in der Anamnese einer der beiden Augen
- Strukturelle Schädigung innerhalb 0,5 Papillenflächen um das Zentrum der Makula des Studienauges ohne Aussicht auf Verbesserung des Visus nach Ödemresorption (einschließlich Atrophie des retinalen Pigmentepithels, subretinale Fibrose, Lasernarben, epiretinale Membranen mit Fovea-Beteiligung oder organisierte, harte Exsudate)
- Andere Augenerkrankungen des Studienauges, welche die Interpretation der Studienergebnisse beeinflussen konnten, den Visus beeinträchtigten oder die eine medikamentöse oder chirurgische Intervention während der 12-monatigen Studienphase benötigten, inklusive Katarakt, Zentralvenenverschluss, Netzhautablösung, Makula-Loch oder choroidale Neovaskularisation jeglicher Ursache außer der eines DMEs (z.B. AMD, okulare Histoplasmose, pathologische Myopie)
- Unkontrolliertes Glaukom in einem Auge (z.B. IOP > 24 mmHg trotz Medikation oder nach Ansicht des Studienarztes)
- Neovaskularisation der Iris, vitreomakuläres Traktionssyndrom oder Glaskörperblutung in einem Auge
- Monokulare Patienten oder Patienten mit einem BCVA < 24 Buchstaben (Snellenäquivalent ~ 20/320) im Begleitaug (Nicht-Studienauge) bei der ersten Visite

#### **Begleitbehandlungen des Auges**

- Panretinale Laserkoagulation im Studienauge innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienteilnahme
- Fokale/Grid - Laserkoagulation im Studienauge innerhalb der letzten 3 Monate vor Studienteilnahme
- Behandlung mit anti-angiogenen Substanzen (Pegaptanib-Natrium, Anecortave Acetat, Bevacizumab, Ranibizumab, etc.) im Studienauge innerhalb der letzten 3 Monate vor Randomisierung
- Jede intraokulare Operation des Studienauges innerhalb der letzten 3 Monate vor Randomisierung
- Vitrektomie in der Anamnese des Studienauges
- Phakes Studienauge mit intravitrealer Kortikosteroid-Gabe in der Anamnese
- Intravitreale Kortikosteroid-Gabe nach Katarakt-Operation am Studienauge (aphak oder pseudophak ohne Verletzung der posterioren Kapsel) innerhalb von 3 Monaten vor Randomisierung

- Gegebenheiten des Studienauges, die eine chronische Begleittherapie mit lokalen oder systemisch angewandten Kortikosteroiden erforderlich machten

### **Systemische Erkrankungen**

- Schlaganfall oder transitorische ischämische Attacke (TIA) in der Anamnese.
- Nierenversagen, welches einer Dialyse oder Nierentransplantation bedurfte oder eine Niereninsuffizienz mit einem GFR  $< 30 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$
- Unbehandelter Diabetes mellitus
- Blutdruck systolisch  $> 160 \text{ mmHg}$  oder diastolisch  $> 100 \text{ mmHg}$
- Unbehandelte Hypertonie oder Änderung der antihypertensiven Medikation innerhalb von 3 Monaten vor Studieneinschluss
- Zum Zeitpunkt des Studienstarts gegenwärtige oder wahrscheinliche Behandlung mit systemischen Medikamenten, welche für die Linse, Retina oder den optischen Nerv toxisch sind (z.B. Deferoxamin, Chloroquin/Hydrochloroquin (Plaquenil), Tamoxifen, Phenothiazine, Ethambutol)
- Bekannte Überempfindlichkeit gegen Ranibizumab, irgendeinem anderen Bestandteil der Studienmedikation Ranibizumab oder Fluorescein
- Jede Art von fortgeschrittener, schwerer oder instabiler Erkrankung oder deren Behandlung, die die primären und/oder sekundären Untersuchungsergebnisse beeinflussen konnte. Dies beinhaltete jedweden medizinischen Zustand, bei dem eine Progression, ein Wiederauftreten oder eine Änderung der Erkrankung in einem Ausmaß erwartet wurde, der die Beurteilung des klinischen Zustandes des Patienten in signifikantem Maße beeinflusst hätte oder den Patienten einem besonderen Risiko aussetzt hätte
- Behandelte oder unbehandelte Malignität in der Anamnese jedweden Organsystems innerhalb der letzten 5 Jahre vor Studienstart, unabhängig davon ob es Hinweise auf ein lokales Rezidiv oder auf Metastasen gab

### **Compliance/Administratives**

- Teilnahme an jeglicher medikamentösen klinischen Prüfung (ausgenommen Vitamine oder Mineralien) innerhalb des letzten Monats (oder innerhalb von 5 Halbwertszeiten des Studienmedikamentes, je nachdem welche Zeitspanne die längere war) vor der Randomisierung
- Frauen, die bei Studienstart
  - schwanger waren oder stillten (Schwangerschaft definiert als Zustand ab Konzeption bis zum Ende der Gestationsphase der Frau, bestätigt durch einen positiven hCG Labortest ( $> 5 \text{ mIU/ml}$ ))
  - menstruierten und gebärfähig\* waren und während und bis mindestens 4 Wochen nach Ende der Studienbehandlung keine medizinisch anerkannte Methode zur Empfängnisverhütung (Pearl Index  $< 1^{**}$ ) verwendeten. Für alle gebärfähigen Frauen wurde rechtzeitig vor Einschluss in die Studie ein negativer Schwangerschaftstest (Serum) benötigt

\* Definition postmenopausaler Zustand: über 12 Monate keine Menstruationsblutung auf natürlichem Weg (spontan) oder seit 6 Monaten ausbleiben der spontanen Menstruationsblutung mit gleichzeitigem Serum FSH Wert von  $> 40 \text{ mIU/ml}$  oder, beidseitige Oophorektomie (Entfernung der Eierstöcke) mit oder ohne Hysterektomie (Entfernung der Gebärmutter) vor mindestens 6 Wochen



\*\* Beispiele besonders zuverlässiger Verhütungsmethoden mit einem Pearl Index (PI) von  $< 1$ , nach der Richtlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe:

- Kombinationspille mit Östrogen und Gestagen (keine Mini-Pille, PI = 0,1 -0,9)
  - Vaginalring (NuvaRing®, PI = 0,65 unkor.; 0,4 korrigiert)
  - Transdermales Verhütungspflaster (EVRA®, PI = 0,72 unkor.; 0,9 korrigiert)
  - Östrogen freie Ovulations-Inhibitoren (Cerazette®, PI = 0,14)
  - Gestagen enthaltende Kontrazeptiva (Implanon®, PI = 0 - 0,08)
  - Injizierbare Gestagen Präparate, (3-Monats-Spritze, PI = 0,3 – 1,4; 0,88 korrigiert)
  - Gestagen Hormonspirale (Mirena®, PI 0 0,16)
- Beachtung der studienbedingten Anweisungen/Maßnahmen war nicht sichergestellt

## 8.2 Durchführung der Studienbehandlung

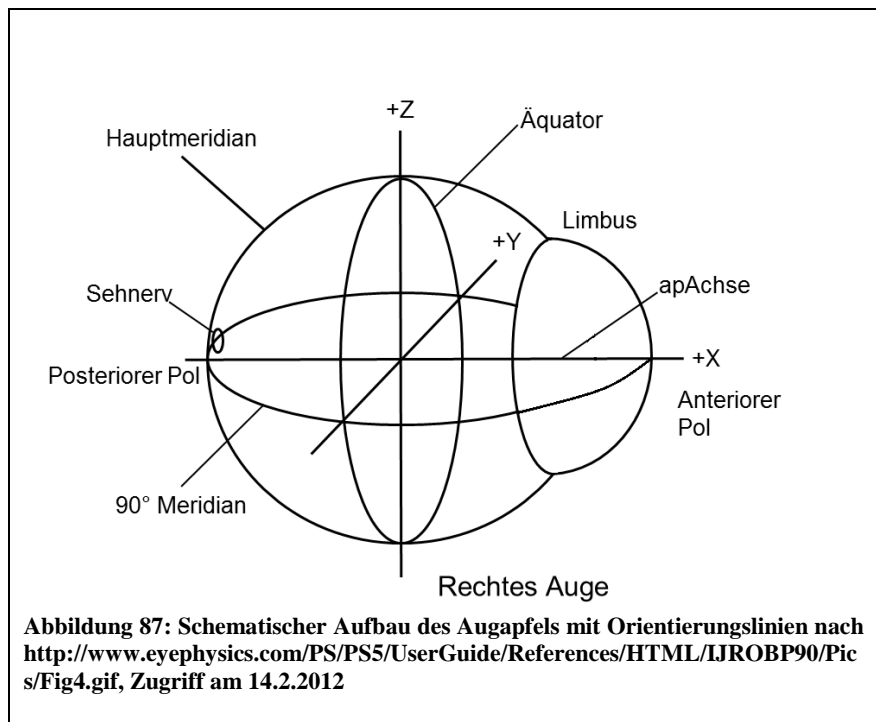
### Ranibizumab Injektion

Um potentielle Risiken der Ranibizumab Injektion zu vermeiden, ist aseptisches Arbeiten notwendig. Eine weitere Vorsichtsmaßnahme, die zum Studienzeitpunkt noch durchgeführt wurde, ist die lokale Gabe von Antibiotika ins Studienaue, 3 Tage vor und nach der Behandlung. Mittlerweile gibt es ausreichend Evidenz, dass die Antibiotika Gabe nicht notwendig ist, um das Infektionsrisiko einzudämmen. Die Fachinformation von Lucentis® enthält seit Anfang 2014 keine Empfehlung zur Antibiotika Gabe mehr.

Wird eine intravitreale Injektion mit Ranibizumab durchgeführt, sollten laut Gebrauchsinformation von Lucentis® die folgenden Prozeduren eingehalten werden, um die Gefahr von Endzündungen und Infektionen, allen voran einer Endophthalmitis zu verhindern:

Im OP-Saal wird ein steriles Feld vorbereitet. Nachdem zwei Tropfen eines Anästhetikums ins Studienaue gegeben wurden, folgen zwei Tropfen einer Antibiotika Lösung. Um die periokuläre Haut und das Augenlid des Studienaues zu desinfizieren, werden mit einem Povidon-Iod getränkten Tupfer Augenlider, Wimpern und periorbitale Haut abgewischt. Dabei startet man mit Augenlider und Wimpern und arbeitet sich zur periokulären Haut vor. Die Arbeitsweise ist von innen nach außen (medial zu temporal). Ein steriles Abdecktuch wird über das desinfizierte Areal gelegt und ein steriles Spekulum unter das Augenlid eingesetzt. Um sicherzugehen, dass der Applikationsort auf der Bindehaut desinfiziert ist, werden zwei Tropfen ophthalmologischer Povidon-Iod Lösung ins Studienaue gegeben. Nach 90 Sekunden wird ein Tupfer getränkt mit Anästhetikum 10 Sekunden auf die Injektionsstelle gedrückt. Überschüssige Flüssigkeit wird mit einem sterilen Tupfer aufgesaugt. Nun wird der Patient angewiesen, seinen Blick von der Spritze abzuwenden (Richtung Nase).

Die Nadel wird 3,5 bis 4 mm posterior zum Limbus eingebracht (Abbildung 87). Die zuvor vorbereitete 10 mg/ml Ranibizumab Lösung (s. unten) wird nun langsam injiziert. Bei der Applikation sollte der horizontale Meridian vermieden werden und in Richtung der Glaskörpermitte gezielt werden. Nach der Injektion des gesamten Volumens sollte die Nadel vorsichtig entfernt werden. Direkt im Anschluss an die Injektion werden 2 Tropfen einer Antibiotikalösung in das



Studienauge gegeben und mittels *Fingerzählen* der Visus des Patienten überprüft. Bei weiteren Injektionen sollte jeweils eine neue Injektionsstelle auf der Sklera verwendet werden.

Die Ranibizumab Lösung befindet sich in einer mit einem Gummistopfen verschlossenen Durchstechflasche. Der Gummistopfen muss von außen desinfiziert werden, bevor die Ranibizumab Lösung aufgezogen wird. Mit einer 5 µm Filterkanüle wird der Gummistopfen durchstochen und 0,2ml der Ranibizumab Lösung in eine 1 ml Spritze aufgezogen. Die Filterkanüle wird entfernt, eine Injektionskanüle aufgesetzt und entlüftet bis die 0,05 ml Markierung eingestellt ist. Nun ist die Spritze fertig zur Injektion.

### Scheininjektion

Zur Aufrechterhaltung der Verblindung des Patienten, muss in der Lasergruppe der Schein erweckt werden, dass eine Injektion gegeben wird. Eine solche Scheininjektion wird folgendermaßen durchgeführt: ein leeres Glasvial wird bereitgestellt und das Auge wie bei einer ganz normalen intravitrealen Injektion vorbereitet. Der Patient wird wie bei jeder intraokularen Injektion angewiesen seinen Blick von der Spritze weg zu richten. Wie bei einer regulären Injektion sieht der Patient den Spritzenfüllstand nicht. Der Arzt zieht den Kolben einer Spritze bis zur 0,05 ml Marke der Spritze heraus und platziert die Spritze ohne Kanüle auf dem betäubten Augapfel. Die Spritze wird auf nun auf den Augapfel gedrückt und der Kolben betätigt. Es wird also Druck ausgeübt und der Patient bemerkt, dass der Kolben betätigt wird. Da das Auge betäubt ist, spürt der Patient den Unterschied zu einer echten Injektion nicht, da beide Male ein Druck auf den Augapfel empfunden wird. Wichtig ist, dass alle Abläufe einer echten Injektion so ähnlich wie möglich sind. Alle Schritte zur Vorbereitung und Nachbereitung des Studienauges sollten genauso wie bei einer Injektion mit Ranibizumab durchgeführt werden. So sollte z.B. auch die (Schein-) Injektionsstelle auf der Sklera wandern.

## **Laserphotokoagulation**

In dieser Studie kamen zwei verschiedene Lasermodalitäten zum Einsatz. Einerseits die Laserphotokoagulation zur Behandlung des DMÖ, andererseits die Laserphotokoagulation zur Behandlung der PDR.

### Laserphotokoagulation zur Behandlung des DMÖ

Im Prüfplan wurden genaue Anweisungen für die Photokoagulation gegeben. Diese entsprechen den aktuellen Empfehlungen für die Anwendung von Laserkoagulation bei DMÖ bzw. PDR [296, 297]. Je nach Krankheitsbild wird entweder eine fokale Laserbehandlung oder eine grid-Lasertechnik für DMÖ und/oder eine panretinale Laserbehandlung für PDR angewandt.

- Bei der fokalen Laserkoagulation werden leckende Mikroaneurysmen direkt im Bereich der retinalen Verdickung koaguliert, 500–3000 µm vom Zentrum der Makula entfernt. Sollte der Visus schlechter als 20/40 (d.h. ungefähr 70 ETDRS Buchstaben) sein, kann eine Behandlung auch im Bereich zwischen 300 und 500 µm vom Zentrum der Makula stattfinden, wenn ein Ödem, welches das Zentrum betrifft trotz fokaler Koagulation fortbesteht. Durch die Behandlung kann sich ein Mikroaneurysma verfärben, leichte grau-weiße Laserherde sollten unter den Mikroaneurysmen sichtbar sein. Die Laserherde sollten 50–100 µm groß sein, bei einer Expositionszeit von 0,05 bis 0,1 Sekunden.
- Die Grid-Technik (gitterförmige Applikation) soll bei Ödemen angewandt werden, die nicht mit fokalen Leckagen aus Mikroaneurysmen assoziiert sind. Die 50–100 µm großen Herde werden 500 bis 3000 µm vom Zentrum der Makula entfernt gesetzt. Die Expositionszeit sollte 0,05 bis 0,1 Sekunden betragen und der Grid sollte eine leichte Weißfärbung hervorrufen. Die Herde sollten mindestens zwei Herddurchmesser auseinander liegen.

### Laserphotokoagulation zur Behandlung der PDR

Die Panretinale Laserphotokoagulation (PRP) kommt bei Patienten mit einer PDR zum Einsatz [296, 297]. Die Laserherde werden bei der PRP flächig gesetzt, beginnend mit einem Abstand von mindestens 2 Papillendurchmessern von der Fovea entfernt, bis hin zum Äquator. Als Herdgröße sollten 500 µm gewählt werden und es sollte immer ein Herddurchmesser Abstand eingehalten werden. Zwischen 1200 und 1600 Herde werden gesetzt, wobei die Expositionszeit zwischen 0,1 bis 0,2 Sekunden betragen sollte. Gewöhnlich wird die PRP Behandlung auf zwei bis fünf Sitzungen verteilt, die innerhalb von drei bis sechs Wochen durchgeführt werden. In einer Sitzung sollten nicht mehr als 500-600 Herde gesetzt werden. Sollten nach zwei bis vier Monaten noch Neovaskularisationen vorhanden sein oder sich nicht ausreichend zurückgebildet haben, kann eine weitere PRP Sitzung mit bis zu 500 Herden angewandt werden.

Grundsätzlich sollte die Laserbehandlung mindestens 30 Minuten vor der Schein-/ Ranibizumab-Injektion vorgenommen werden.

## **8.3 Information zur Sicherheit von Ranibizumab und Tabellen der unerwünschten Ereignisse**

### **8.3.1 Sicherheitsprofil von Ranibizumab**

In der Fachinformation von Lucentis® ist das Sicherheitsprofil von Ranibizumab beschrieben, das sich aus zahlreichen Studienergebnissen ergeben und bestätigt hat.

Folgende Warnhinweise haben sich aus den Studien oder präklinischen Untersuchungen ergeben:

- Ranibizumab darf nicht eingesetzt werden, wenn eine akute Entzündung am oder im Auge vorliegt.
- Alle Arten von intravitrealen Injektionen bergen das Risiko für eine Endophthalmitis, eine intraokuläre Entzündung, eine rhegmatogene Netzhautablösung, einen Einriss der Retina oder einer iatrogenen traumatischen Katarakt. Zur Vermeidung v.a. intraokulärer Entzündung, muss Ranibizumab unter aseptischen Injektionsbedingungen injiziert werden. Patienten sollten daher nach einer Injektion eine Woche lang überwacht werden und über Symptome einer Entzündung aufgeklärt werden, damit sie rechtzeitig behandelt werden können.
- Da vorübergehende Druckanstiege nach einer intravitrealen Injektion beobachtet wurden, sollte der IOP und die Perfusion des Sehnervenkopfs innerhalb 60 Minuten nach der Injektion kontrolliert werden. Gegebenenfalls muss eine Behandlung durchgeführt werden.
- Die Therapie ist auszusetzen bei folgenden Ereignissen:
  - Verlust von  $\geq 30$  Buchstaben im Vergleich zur zuletzt gemessenen Sehstärke
  - IOP  $\geq 30$  mmHg
  - Riss der Retina (rhegmatogener Netzhautriss oder Makulalöcher)
  - Foveal gelegene subretinale Blutungen, oder Blutungen, die mehr als 50 % der Läsionsgröße betreffen (nur für AMD Patienten zutreffend)
  - Operationen, die in den letzten 28 Tagen stattfanden oder für die nächsten 28 Tage geplant sind
- Patienten müssen aufgeklärt werden über mögliche Pigmentepithelrisse, Entzündungsreaktionen und systemische Effekte, die als Gruppenwirkung aller VEGF-Inhibitoren eingestuft wurden (systemische Nebenwirkungen, einschließlich nicht-okularer Hämorrhagien und arterieller thrombembolischer Ereignisse)
- Es dürfen keine Schwangeren oder stillenden Frauen mit anti-VEGF behandelt werden

Es folgt das Nebenwirkungsprofil von Ranibizumab wie in der Fachinformation von Lucentis® (Version Januar 2014) beschrieben:

„Zusammenfassung des Sicherheitsprofils:

Die Mehrzahl der nach einer Lucentis-Behandlung gemeldeten Nebenwirkungen steht im Zusammenhang mit dem intravitrealen Injektionsvorgang. Die am häufigsten berichteten, das Auge betreffenden Nebenwirkungen nach einer Lucentis-Injektion sind: Augenschmerzen, okuläre Hyperämie, erhöhter Augeninnendruck, Vitritis, Glaskörperabhebung, Einblutungen in die Retina, Beeinträchtigung der Sehfähigkeit, *Fliegende Mücken* (Mouches volantes), Bindehautblutung, Augenirritation, Fremdkörpergefühl im Auge, verstärkter Tränenfluss, Blepharitis, trockenes Auge und Pruritus des Auges.

Die am häufigsten berichteten, nicht das Auge betreffenden Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, Nasopharyngitis und Arthralgie.

Seltener berichtete, aber schwerwiegendere Nebenwirkungen sind Endophthalmitis, Erblindung, Netzhautablösung, Einriss der Retina und iatrogene traumatische Katarakt [...].

Patienten sollten über die Symptome dieser möglichen Nebenwirkungen informiert werden und angehalten werden, ihren Arzt zu informieren, wenn sie Symptome entwickeln wie Augenschmerzen oder zunehmende Beschwerden, Verschlechterung der Augenrötung, verschwommenes oder vermindertes Sehvermögen, eine zunehmende Zahl kleiner Partikel in ihrem Sichtfeld oder erhöhte Lichtsensibilität.

Die in klinischen Studien nach einer Lucentis-Behandlung aufgetretenen Nebenwirkungen sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.“

Tabellarische Auflistung der Nebenwirkungen (Nebenwirkungen wurden definiert als unerwünschte Ereignisse (bei mindestens 0,5 Prozentpunkten der Patienten) welche häufiger (mindestens 2 Prozentpunkte) bei mit 0,5 mg Lucentis behandelten Patienten auftraten als bei jenen der Kontrollgruppe (Scheininjektion oder Verteporfin-PDT).

„Die Nebenwirkungen sind nach Organsystemklassen und der Häufigkeit ihres Auftretens nach folgender Konvention geordnet:

- Sehr häufig ( $\geq 1/10$ ),
- häufig ( $\geq 1/100$ ,  $< 1/10$ ),
- gelegentlich ( $\geq 1/1.000$ ,  $< 1/100$ ),
- selten ( $\geq 1/10.000$ ,  $< 1/1.000$ ),
- sehr selten ( $< 1/10.000$ ),
- nicht bekannt (Häufigkeit auf Grundlage der verfügbaren Daten nicht abschätzbar).

Innerhalb jeder Häufigkeitsgruppe werden die Nebenwirkungen nach abnehmendem Schweregrad angegeben.

#### **Infektionen und parasitäre Erkrankungen**

- Sehr häufig: Nasopharyngitis
- Häufig: Harnwegsinfektionen (nur in der DMÖ-Population beobachtet)

#### **Erkrankungen des Blutes und des Lymphsystems**

- Häufig: Anämie

#### **Erkrankungen des Immunsystems**

- Häufig: Hypersensitivitätsreaktionen

#### **Psychiatrische Erkrankungen**

Häufig: Angstzustände

#### **Erkrankungen des Nervensystems**

Sehr häufig: Kopfschmerzen

#### **Augenerkrankungen**

Sehr häufig: Vitritis, Glaskörperabhebung, Einblutungen in die Retina, Beeinträchtigung der Sehfähigkeit, Augenschmerzen, *Fliegende Mücken* (*Mouches volantes*), Bindehautblutung, Augenirritation, Fremdkörpergefühl im Auge, verstärkter Tränenfluss, Blepharitis, trockenes Auge, okuläre Hyperämie, Pruritus des Auges.

Häufig: Netzhautdegeneration, Funktionsstörungen der Retina, Netzhautablösung, Netzhauteinriss, Abhebung des retinalen Pigmentepithels, Einriss des retinalen Pigmentepithels, Visusverschlechterung, Glaskörperblutung, Funktionsstörungen des Glaskörpers, Uveitis, Iritis, Iridozyklitis, Katarakt, subkapsuläre Katarakt, Trübung der hinteren Linsenkapsel, Keratitis punctata, Abrasio corneae, Reizzustand der Vorderkammer, Verschwommensehen, Blutungen an der

Injektionsstelle, Einblutungen ins Auge, Konjunktivitis, allergische Konjunktivitis, Augentränen, Photopsie, Photophobie, Augenbeschwerden, Augenlidödem, Augenlidschmerzen, Hyperämie der Konjunktiva.

Gelegentlich: Erblindung, Endophthalmitis, Hypopyon, Vorderkammerblutung, Keratopathie, Irisadhäsion, Ablagerungen auf der Kornea, Ödeme der Kornea, Striae der Kornea, Schmerzen an der Injektionsstelle, Reizungen an der Injektionsstelle, abnormes Gefühl im Auge, Reizungen des Augenlids.

### **Erkrankungen der Atemwege, des Brustraums und Mediastinums**

Häufig: Husten

### **Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts**

Häufig: Übelkeit

### **Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes**

Häufig: Allergische Reaktionen (Hautausschlag, Urticaria, Pruritus, Erythem)

### **Skelettmuskulatur-, Bindegewebs- und Knochenkrankungen**

Sehr häufig: Arthralgie

### **Untersuchungen**

Sehr häufig: Erhöhung des Augeninnendrucks“ (Quelle: Fachinformation von Lucentis®, Version Januar 2014).

Es gibt produktklassenspezifische Nebenwirkungen, die in Phase-III-Studien zur feuchten AMD berichtet wurden. Bei Ranibizumab behandelten Patienten war „die Gesamthäufigkeit des Auftretens von Blutungen außerhalb des Auges eine Nebenwirkung, die möglicherweise mit der systemischen VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor)-Inhibierung zusammenhängt, leicht erhöht. Es gab jedoch keine einheitliche Verteilung innerhalb der verschiedenen Blutungstypen. Es besteht ein theoretisches Risiko für arterielle thrombembolische Ereignisse, einschließlich Schlaganfall und Herzinfarkt, nach der intravitrealen Anwendung von VEGF-Inhibitoren. In klinischen Studien mit Lucentis an Patienten mit AMD, DMÖ, RVV und PM wurde eine geringe Inzidenzrate für arterielle thrombembolische Vorkommnisse beobachtet. Es gab keine größeren Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, die mit Ranibizumab behandelt wurden im Vergleich zur Kontrolle.“ (Quelle: Fachinformation von Lucentis®, Version Januar 2014)

### **8.3.2 Definitionen unerwünschter Ereignisse**

Definition unerwünschtes Ereignis (AE, adverse event): ein AE ist jegliches unvorhergesehenes medizinischer Ereignis. Das kann ein unvorteilhaftes oder ungewolltes Anzeichen, Symptom oder eine Erkrankung sein, gegebenenfalls auch ein abnormer Laborwert.

Definition schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SAE, serious adverse event): Ein SAE ist ein AE, für dessen Auftreten oder Verschlechterung wenigstens eines der folgenden Kriterien zutrifft:

- Tödlich oder lebensbedrohlich
- Führt zu bleibenden oder erheblichen Behinderungen/Invalidität

- Führt zu einer angeborenen Anomalität/Geburtsfehler
- Bedarf einer Hospitalisierung oder einer Verlängerung eines Krankenhausaufenthalts (außer Hospitalisierung auf Grund:
  - Einer Routinebehandlung oder Monitoring der untersuchten Indikation, die nicht mit einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes einhergeht;
  - einer wahlweise durchgeführte oder schon geplante Behandlung eines bereits bestehenden Zustandes, der nicht mit der Indikation zusammenhängt und sich nicht verschlechtert hat seit Studienstart;
  - eines ambulanten Eingriffs, der nicht zu einem der gelisteten Zustände führt und der nicht in einem Krankenhausaufenthalt endet;
  - eines Krankenhausaufenthalts wegen sozialer Gründe oder Kurmaßnahmen, die nicht wegen einer generellen Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Patienten durchgeführt wurde)
- ist medizinisch signifikant, d.h. es handelt sich um einen Vorfall, der den Patienten gefährdet oder der eine medizinische oder operative Intervention erfordert, um die oben genannten Zustände eines Patienten zu verhindern.

### 8.3.3 Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse RELATION Studie

#### 8.3.3.1 Cardiac Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CARDIAC FAILURE CONGESTIVE	1 (1,3)	0	1 (0,9)
CORONARY ARTERY DISEASE	0	1 (2,6)	1 (0,9)
CORONARY ARTERY STENOSIS	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.3.2 Eye Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
DIABETIC RETINAL OEDEMA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
DIABETIC RETINOPATHY	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RETINAL DEGENERATION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RETINAL DETACHMENT	0	3	3 (2,6)
VITREOUS HAEMORRHAGE	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.3.3 Gastrointestinal Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ANAL SPHINCTER ATONY	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.3.4 General Disorders and administrative site Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CONCOMITANT DISEASE PROGRESSION	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.3.5 Hepatobiliary Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CHOLECYSTITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.3.6 Infections and Infestations

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CELLULITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.3.7 Metabolism and Nutrition Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
DIABETES MELLITUS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
DIABETIC FOOT	1 (1,3)	0	1 (0,9)
HYPOGLYCAEMIA	2 (2,6)	0	2 (1,8)
TYPE 1 DIABETES MELLITUS	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.3.8 Musculoskeletal and Connective Tissue Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CHONDROPATHY	0	1 (2,6)	1 (0,9)
OSTEOARTHRITIS	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.3.9 Neoplasm benign, malignant and unspecified (incl. Cysts and Polyps)

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
GASTROINTESTINAL TRACT ADENOMA	1 (1,3)	0	1 (0,9)



### 8.3.3.10 Nervous System Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CEREBROVASCULAR ACCIDENT	1 (1,3)	0	1 (0,9)
LOSS OF CONSCIOUSNESS	1 (1,3)	0	1 (0,9)

### 8.3.3.11 Vascular Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
HYPERTENSION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
HYPERTENSIVE CRISIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
PERIPHERAL ARTERIAL OCCLUSIVE DISEASE	1 (1,3)	0	1 (0,9)
THROMBOPHLEBITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)

## 8.3.4 Unerwünschte Ereignisse RELATON Studie

### 8.3.4.1 Blood and Lymphatic System Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ANAEMIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
THROMBOCYTOPENIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)

### 8.3.4.2 Cardiac Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ATRIAL FIBRILLATION	1 (1,3)	0	1 (0,9)

### 8.3.4.3 Ear and Labyrinth Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
VERTIGO	1 (1,3)	1 (2,6)	2 (1,8)

### 8.3.4.4 Eye Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ABNORMAL SENSATION IN EYE	1 (1,3)	2 (5,3)	3 (2,6)
CATARACT	2 (2,6)	0	2 (1,8)

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CONJUNCTIVAL HAEMORRHAGE	7 (9,2)	0	7 (6,1)
CONJUNCTIVITIS	2 (2,6)	1 (2,6)	3 (2,6)
DIABETIC RETINAL OEDEMA	5 (6,6)	2 (5,3)	7 (6,1)
DIABETIC RETINOPATHY	3 (3,9)	0	3 (2,6)
DRY EYE	2 (2,6)	1 (2,6)	3 (2,6)
ECZEMA EYELIDS	2 (2,6)	0	2 (1,8)
ERYTHEMA OF EYELID	1 (1,3)	0	1 (0,9)
EYE DISCHARGE	1 (1,3)	0	1 (0,9)
EYE HAEMORRHAGE	1 (1,3)	0	1 (0,9)
EYE IRRITATION	5 (6,6)	0	5 (4,4)
EYE PAIN	15 (19,7)	7 (18,4)	22 (19,3)
EYE PRURITUS	4 (5,3)	0	4 (3,5)
EYE SWELLING	3 (3,9)	2 (5,3)	5 (4,4)
FOREIGN BODY SENSATION IN EYES	1 (1,3)	2 (5,3)	3 (2,6)
LACRIMATION INCREASED	6 (7,9)	1 (2,6)	7 (6,1)
MACULAR FIBROSIS	3 (3,9)	0	3 (2,6)
MACULAR OEDEMA	4 (5,3)	1 (2,6)	5 (4,4)
METAMORPHOPSIA	2 (2,6)	0	2 (1,8)
OCULAR HYPERAEMIA	5 (6,6)	2	7 (6,1)
OPTIC ISCHAEMIC NEUROPATHY	1 (1,3)	0	1 (0,9)
POSTERIOR CAPSULE OPACIFICATION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RETINAL TEAR	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RETINOPATHY HYPERTENSIVE	0	1 (2,6)	1 (0,9)
VISUAL ACUITY REDUCED	4 (5,3)	0	4 (3,5)
VISUAL IMPAIRMENT	2 (2,6)	0	2 (1,8)
VITREOUS ADHESIONS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
VITREOUS DISORDER	1 (1,3)	0	1 (0,9)
VITREOUS FLOATERS	3 (3,9)	0	3 (2,6)
VITREOUS HAEMORRHAGE	2 (2,6)	0	2 (1,8)
VITREOUS OPACITIES	3 (3,9)	0	3 (2,6)

#### 8.3.4.5 Gastrointestinal Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ABDOMINAL PAIN UPPER	0	1 (2,6)	1 (0,9)
CONSTIPATION	0	1 (2,6)	1 (0,9)
DIARRHOEA	1 (1,3)	1 (2,6)	1 (0,9)
GASTROOESOPHAGEAL REFLUX DISEASE	3 (3,9)	0	3 (2,6)
PERIODONTITIS	1 (1,3)	1 (2,6)	2 (1,8)
TOOTHACHE	2 (2,6)	0	2 (1,8)

#### 8.3.4.6 General Disorders and Administration Site Conditions

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
FATIGUE	0	1 (2,6)	1 (0,9)
LOCAL SWELLING	1 (1,3)	0	1 (0,9)
PAIN	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.4.7 Allergic Conditions

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
HYPERSENSITIVITY	2 (2,6)	0	2 (1,8)
IODINE ALLERGY	1 (1,3)	0	1 (0,9)
DRUG HYPERSENSITIVITY	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.4.8 Infections and Infestations

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
BRONCHITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
CYSTITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
GASTROENTERITIS	1 (1,3)	1 (2,6)	2 (1,8)
HERPES ZOSTER	0	1 (2,6)	1 (0,9)
NASOPHARYNGITIS	18 (23,7)	6 (15,8)	24 (21,1)
RESPIRATORY TRACT INFECTION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RHINITIS	2 (2,6)	0	2 (1,8)

### 8.3.4.9 Injury, Poisoning and Procedural Complications

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CONCUSSION	0	1 (2,6)	1 (0,9)
CONTUSION	0	1 (2,6)	1 (0,9)
EPICONDYLITIS	0	1 (2,6)	1 (0,9)
FALL	1 (1,3)	0	1 (0,9)
POST-TRAUMATIC NECK SYNDROME	0	1 (2,6)	1 (0,9)
TOOTH FRACTURE	0	1 (2,6)	1 (0,9)

### 8.3.4.10 Investigations

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
BLOOD GLUCOSE INCREASED	1 (1,3)	0	1 (0,9)
BLOOD POTASSIUM INCREASED	2 (2,6)	1 (2,6)	3 (2,6)
GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE INCREASED	2 (2,6)	0	2 (1,8)
GLYCOSYLATED HAEMOGLOBIN INCREASED	2 (2,6)	1 (2,6)	3 (2,6)
INTRAOCULAR PRESSURE INCREASED	3 (3,9)	0	3 (2,6)

### 8.3.4.11 Metabolism and Nutrition Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
DIABETES MELLITUS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
GOUT	1 (1,3)	0	1 (0,9)
HYPERCHOLESTEROLAEMIA	0	1 (2,6)	1 (0,9)
HYPOGLYCAEMIA	2 (2,6)	0	2 (1,8)
HYPOGLYCAEMIC SEIZURE	1 (1,3)	0	1 (0,9)

### 8.3.4.12 Musculoskeletal and Connective Tissue Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
ARTHRALGIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
BACK PAIN	3 (3,9)	3 (7,9)	6 (5,3)
EXOSTOSIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
INTERVERTEBRAL DISC PROTRUSION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
MENISCAL DEGENERATION	0	1 (2,6)	1 (0,9)
MUSCLE SPASMS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
MUSCULOSKELETAL PAIN	2 (2,6)	0	2 (1,8)
NECK PAIN	0	1 (2,6)	1 (0,9)
OSTEOARTHRITIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
SJOGREN'S SYNDROME	1 (1,3)	0	1 (0,9)
TENOSYNOVITIS	0	2 (5,3)	2 (1,8)

### 8.3.4.13 Nervous System Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CARPAL TUNNEL SYNDROME	1 (1,3)	0	1 (0,9)
CONVULSION	0	1 (2,6)	1 (0,9)
DIZZINESS	0	1 (2,6)	1 (0,9)
HEADACHE	5 (6,6)	2 (5,3)	7 (6,1)
HYPOAESTHESIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
MIGRAINE	2 (2,6)	0	2 (1,8)
PARAESTHESIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
SCIATICA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
SYNCOPE	0	1 (2,6)	1 (0,9)

### 8.3.4.14 Psychiatric Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
INSOMNIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RESTLESSNESS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
SLEEP DISORDER	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.4.15 Renal and Urinary Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
CALCULUS URINARY	1 (1,3)	0	1 (0,9)
NEPHROLITHIASIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
RENAL IMPAIRMENT	0	1 (2,6)	1 (0,9)

#### 8.3.4.16 Reproductive System and Breast Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA	1 (1,3)	0	1 (0,9)

#### 8.3.4.17 Respiratory, Thoracic and Mediastinal Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
COUGH	2 (2,6)	1 (2,6)	3 (2,6)

#### 8.3.4.18 Skin and Subcutaneous Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
BLISTER	2 (2,6)	0	2 (1,8)
DERMATITIS ATOPIC	1 (1,3)	0	1 (0,9)
ERYTHEMA	1 (1,3)	1 (2,6)	2 (1,8)
SKIN LESION	1 (1,3)	2 (5,3)	3 (2,6)

#### 8.3.4.19 Vascular Disorders

	Kombination n (%)	Laser n (%)	Gesamt n (%)
HAEMATOMA	1 (1,3)	0	1 (0,9)
HYPERTENSION	5 (6,6)	7 (18,4)	12 (10,5)
HYPERTENSIVE CRISIS	1 (1,3)	0	1 (0,9)
HYPOTENSION	1 (1,3)	0	1 (0,9)
VENOUS THROMBOSIS LIMB	0	1 (2,6)	1 (0,9)

## 8.4 Tabellen

### Zu Kapitel 3.1.4.1 Primärer Endpunkt und Visusverlauf:

ANCOVA 1: Prim. Endpunkt lt. Prüfplan gefordert:

Tests der Zwischensubjekteffekte					
Abhängige Variable: Unterschied Visus V14 zu Visite 2					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1717,988 <sup>a</sup>	5	343,598	5,622	0,000
Konstanter Term	1496,258	1	1496,258	24,481	0,000
Zentrum	26,307	1	26,307	0,430	0,513
PDR lt. Reading Center	35,023	1	35,023	0,573	0,451
Visus bei Baseline	860,897	1	860,897	14,086	0,000
DMÖ Typ	460,834	1	460,834	7,540	0,007
Behandlung	396,620	1	396,620	6,489	0,012
Fehler	6356,385	104	61,119		
Gesamt	10561,000	110			
Korrigierte Gesamtvariation	8074,373	109			

a. R-Quadrat = 0,213 (korrigiertes R-Quadrat = 0,175)

**Tabelle 88:** ANCOVA Analyse des primären Endpunkts (Veränderung des Visus zwischen Baseline und Visite 14, LOCF) mit den Kovariaten PDR vorhanden (ja/nein), DMÖ-Typ (fokal, intermediate, diffus), Zentrum, Baselinevisus und Behandlung.

### Zu 3.1.6.3 Vorbehandlung mit Lasertherapie

ANCOVA Test des primären Endpunkts unter Berücksichtigung der Laser-Anamnese:

Tests der Zwischensubjekteffekte					
Abhängige Variable: Unterschied Visus V14 zu Visite 2					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	Df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Korrigiertes Modell	1800,596 <sup>a</sup>	6	300,099	4,927	<0,001
Konstanter Term	1543,960	1	1543,960	25,348	<0,001
PDR lt. Reading Center	19,745	1	19,745	0,324	0,570
Zentrum	30,624	1	30,624	0,503	0,480
Visus bei Baseline	804,526	1	804,526	13,208	<0,001
DMÖ Typ	430,291	1	430,291	7,064	0,009
Vorbehandlung mit Laser	82,608	1	82,608	1,356	0,247
Behandlung	412,838	1	412,838	6,778	0,011
Fehler	6273,777	103	60,910		
Gesamt	10561,000	110			
Korrigierte Gesamtvariation	8074,373	109			

a. R-Quadrat = 0,223 (korrigiertes R-Quadrat = 0,178)

**Tabelle 89:** ANCOVA Analyse des primären Endpunkts (Veränderung des Visus zwischen Baseline und Visite 14, LOCF) mit den Kovariaten PDR vorhanden (ja/nein), DMÖ-Typ (fokal, intermediate, diffus), Zentrum, Baselinevisus, Vorbehandlung mit Laser (ja/nein) und Behandlung.

**Zu Kapitel 3.1.6.2 Vorhandensein einer proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR)** die Tabellen auf den nachfolgenden Seiten:



Kombinationsarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
5005	Visus	56	57	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	61	Nur eine Injektion, auf die gut (4 Buchstaben Gewinn) angesprochen wurde, weiterer Visusanstieg und Retinaverdünnung wahrscheinlich
	Visusunterschied zu V2	-1	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
	CRT	721	868	580	580	580	580	580	580	580	580	580	580	580	580	
	CRT-Unterschied zu V2	-147	0	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	-288	
	Injektionen		x	EOS												
5006	Visus	75	77	80	86	87	81	83	82	81	81	81	81	81	81	Sehr gutes Ansprechen (zwischen 3-10 Buchstaben Gewinn), Visus von vorn herein sehr gut, kein großes Verbesserungspotential
	Visusunterschied zu V2	-2	0	3	9	10	4	6	5	4	4	4	4	4	4	
	CRT	230	228	229	224	225	226	244	244	237	237	237	237	237	237	
	CRT-Unterschied zu V2	2	0	1	-4	-3	-2	16	16	9	9	9	9	9	9	
	Injektionen		x	x	x	x				EOS						
6001	Visus	71	70	77	75	76	77	72	78	72	78	69	77	80	80	Initiales, gutes Ansprechen (bis zu 7 Buchstaben), weitere Injektionen, auf die immer gut angesprochen wurde
	Visusunterschied zu V2	1	0	7	5	6	7	2	8	2	8	-1	7	10	10	
	CRT	642	642	231	225	282	230	534	228	626	235	590	262	228	228	
	CRT-Unterschied zu V2	0	0	-411	-417	-360	-412	-108	-414	-16	-407	-52	-380	-414	-414	
	Injektionen		x	x	x	x		x		x		x	x	EOS		
6006	Visus	52	67	69	80	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	Sehr gutes Ansprechen (12 Buchstaben Gewinn nach 4 Injektionen)
	Visusunterschied zu V2	-15	0	2	13	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	CRT	305	309	288	276	280	274	274	274	274	274	274	274	274	274	
	CRT-Unterschied zu V2	-4	0	-21	-33	-29	-35	-35	-35	-35	-35	-35	-35	-35	-35	
	Injektionen		x	x	x	x	EOS									
12004	Visus	73	73	85	85	79	87	71	71	71	71	71	71	71	71	Sehr gutes

Kombinationsarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
	Visusunterschied zu V2	0	0	12	12	6	14	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	Ansprechen auf Upload, Reinjektion wäre an Abschlussvisite nötig gewesen (VA-Abfall, Retina-Verdickung), wegen Studienabbruch nicht durchgeführt
	CRT	272	280	257	247	252	247	339	339	339	339	339	339	339	339	
	CRT-Unterschied zu V2	-8	0	-23	-33	-28	-33	59	59	59	59	59	59	59	59	
	Injektionen		x	x	x	x		EOS								
14004	Visus	69	70	72	73	72	71	75	72	72	73	66	74	71	71	Verhaltener VA-Gewinn, sehr starke ab und Zunahme der Retinadicke zwischendurch, an Abschluss Visite wäre klar Injektion nötig gewesen
	Visusunterschied zu V2	-1	0	2	3	2	1	5	2	2	3	-4	4	1	1	
	CRT	370	349	199	130	192	217	578	192	725	196	610	243	555	555	
	CRT-Unterschied zu V2	21	0	-150	-219	-157	-132	229	-157	376	-153	261	-106	206	206	
	Injektionen		x	x	x	x		x		x		x		EOS		
14012	Visus	62	67	74	79	79	77	72	78	77	81	81	81	81	81	Sehr starke Abnahme der Retinadicke am Anfang, bei jedem Anschwellen wurde behandelt, so dass der Visusgewinn am Ende mit 14 Buchstaben sehr hoch war
	Visusunterschied zu V2	-5	0	7	12	12	10	5	11	10	14	14	14	14	14	
	CRT	558	487	171	162	164	164	246	185	215	167	167	167	167	167	
	CRT-Unterschied zu V2	71	0	-316	-325	-323	-323	-241	-302	-272	-320	-320	-320	-320	-320	
	Injektionen		x	x	x	x		x		x	EOS					
19001	Visus	76	69	79	83	78	83	73	73	73	74	74	74	74	74	Retinadicke bei Studienende sehr hoch trotz Injektion bei vorhergehender Visite, Visus wahrscheinlich
	Visusunterschied zu V2	7	0	10	14	9	14	4	4	4	5	5	5	5	5	
	CRT	382	510	218	221	216	237	486	138	326	652	652	652	652	652	
	CRT-Unterschied zu V2	-128	0	-292	-289	-294	-273	-24	-372	-184	142	142	142	142	142	

Kombinationsarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
	Injektionen		x	x	x	x		x		x	EOS					wegen der Injektion an letzter Visite stabil bei 74
24001	Visus	69	56	67	62	67	66	68	65	70	70	69	69	69	69	Guter VA-Anstieg am Anfang mit deutlicher Reduktion der Retinadicke, Re-injektion nach erneuter Retinaverdickung stabilisiert Visus bei 14/13 Buchstaben
	Visusunterschied zu V2	13	0	11	6	11	10	12	9	14	14	13	13	13	13	
	CRT	441	442	422	409	412	408	345	326	286	307	292	292	292	292	
	CRT-Unterschied zu V2	-1	0	-20	-33	-30	-34	-97	-116	-156	-135	-150	-150	-150	-150	
	Injektionen		x	x	x	x	x				x	EOS				
25004	Visus	64	75	75	71	72	79	72	58	58	58	58	58	58	58	Relativ guter Ausgangsvisus, trotz einer Injektion bei Retinaverdickung fällt Visus ab (auch wenn Retina flach ist), weitere Injektion(en) wegen Studienabbruch nicht möglich.
	Visusunterschied zu V2	-11	0	0	-4	-3	4	-3	-17	-17	-17	-17	-17	-17	-17	
	CRT	459	337	253	266	239	226	393	258	258	258	258	258	258	258	
	CRT-Unterschied zu V2	122	0	-84	-71	-98	-111	56	-79	-79	-79	-79	-79	-79	-79	
	Injektionen		x	x	x	x		x	EOS							
26001	Visus	57	50	57	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	Trotz relativ flacher Retina, schlechter Ausgangsvisus. Upload nicht abgeschlossen, weitere Verbesserungen durch Injektionen wegen Studienabbruch nicht möglich
	Visusunterschied zu V2	7	0	7	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	CRT	253	239	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	171	
	CRT-Unterschied zu V2	14	0	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	-68	
	Injektionen		x	x	EOS											

Kombinationsarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
26005	Visus	46	46	50	50	49	46	49	49	49	49	49	49	49	49	Gutes Ansprechen der Retina, aber eher mäßiger Anstieg des Visus, Studienabbruch verhinderte weitere Behandlung und möglichen positiven Effekt auf Visus
	Visusunterschied zu V2	0	0	4	4	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	
	CRT	550	513	214	203	190	216	177	177	177	177	177	177	177	177	
	CRT-Unterschied zu V2	37	0	-299	-310	-323	-297	-336	-336	-336	-336	-336	-336	-336	-336	
	Injektionen		x	x	x	x	x	EOS								
30002	Visus	59	59	71	72	72	73	73	70	78	78	78	78	78	78	Gutes Ansprechen am Anfang, dass durch rechtzeitige Reinjektionen gehalten und sogar weiter verbessert wurde (19 Buchstaben Gewinn)
	Visusunterschied zu V2	0	0	12	13	13	14	14	11	19	19	19	19	19	19	
	CRT	730	705	512	408	428	245	345	574	148	134	134	134	134	134	
	CRT-Unterschied zu V2	25	0	-193	-297	-277	-460	-360	-131	-557	-571	-571	-571	-571	-571	
	Injektionen		x	x	x	x	x		x	x	EOS					
34002	Visus	47	45	67	55	74	57		48	48	48	48	48	48	48	Sehr gutes initiales ansprechen, das nicht gehalten werden konnte, möglicher Grund ist versäumte V7 und, dass wegen Studienabbruch nicht mehr weiterbehandelt wurde
	Visusunterschied zu V2	2	0	22	10	29	12		3	3	3	3	3	3	3	
	CRT	415	327	528	398	441	535		459	465	465	465	465	465	465	
	CRT-Unterschied zu V2	88	0	201	71	114	208		132	138	138	138	138	138	138	
	Injektionen		x	x	x	x	x		x	EOS						
41002	Visus	58	69	57	69	68	63	63	63	63	63	63	63	63	63	Trotz gutem Ansprechen der Retina,

Kombinationsarm		V1	V2	V3	V 4	V 5	V 6	V 7	V 8	V 9	V 10	V 11	V 12	V 13	V 14	Kommentar
	Visusunterschied zu V2	-11	0	-12	0	-1	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6	Visusanstieg nicht gegeben. Wegen frühem Behandlungsende auf Grund des Studienabbruchs keine weitere Therapie und damit Chance auf weitere Verbesserung möglich gewesen
	CRT	450	416	365	282	262	283	283	283	283	283	283	283	283	283	
	CRT-Unterschied zu V2	34	0	-51	-134	-154	-133	-133	-133	-133	-133	-133	-133	-133	-133	
	Injektionen		x	x	x	x	EOS									
48005	Visus	56	57	54	52	56	54	54	54	54	54	54	54	54	54	Gutes Ansprechen der Retina, was sich aber nicht auf Visus auswirkt, Studienabbruch verhinderte weitere Behandlung und möglichen positiven Effekt auf Visus;
	Visusunterschied zu V2	-1	0	-3	-5	-1	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	-3	
	CRT	329	321	318	300	290	281	281	281	281	281	281	281	281	281	
	CRT-Unterschied zu V2	8	0	-3	-21	-31	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	-40	
	Injektionen		x	x	x	x	EOS									
48006	Visus	51	62	58	53	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51	Upload nicht abgeschlossen, daher unbekannt ob weitere Reduktion und ob VA Anstieg möglich gewesen wäre
	Visusunterschied zu V2	-11	0	-4	-9	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	-11	
	CRT	369	381	280	300		273	273	273	273	273	273	273	273	273	
	CRT-Unterschied zu V2	-12	0	-101	-81		-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	-108	
	Injektionen		x	x	x	EOS										
59002	Visus	78	73	77	78	76	78	80	80	80	80	80	80	80	80	Visusanstieg gut (7 Buchstaben)
	Visusunterschied	5	0	4	5	3	5	7	7	7	7	7	7	7	7	

Kombinationsarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
	zu V2															Gewinn)
	CRT			314	280	281		268	262	262	262	262	262	262	262	
	CRT-Unterschied zu V2															
	Injektionen		x	x	x	x	x	x	EOS							

**Tabelle 90: Visusentwicklung und Retinadickenänderung unter Therapie bei den PDR Patienten im Kombinationsarmarm mit Patientennummer, Visusverlauf, Visusunterschied zu Visite 2 (V2, Baseline), Verlauf der CRT (zentrale Retinadicke, vom Zentrum gemessen), CRT-Unterschied zu Visite 2 (V2, Baseline) inkl. Gabe von Injektionen; V=Visite, EOS=End of Study/Studienende für den jeweiligen Patienten**

Laserarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
<b>5004</b>	Visus	40	41	42	45	45	45	46	41	46	42	42	42	42	42	Ausgangsvisus sehr gering, mäßiges Ansprechen, Retinadicke Anfangs enorm, aber teilweise sehr gutes Ansprechen auf Laser
	Visusunterschied zu V2	-1	0	1	4	4	4	5	0	5	1	1	1	1	1	
	CRT	873	771	517	555	790	793	499	982	500	901	901	901	901	901	
	CRT-Unterschied zu V2	102	0	-254	-216	19	22	-272	211	-271	130	130	130	130	130	
	Scheininjektionen		x	x	x	x	x	x	x	x						
<b>6004</b>	Visus	67	68	73	63	70	60	65	65	58	61	61	61	61	61	Gemäßigtes Ansprechen auf Lasertherapie, mäßiges Abflachen der Retina, aber vor allem Visusverluste
	Visusunterschied zu V2	-1	0	5	-5	2	-8	-3	-3	-10	-7	-7	-7	-7	-7	
	CRT	583	670	652	647	629	559	590	518	533	520	520	520	520	520	
	CRT-Unterschied zu V2	-87	0	-18	-23	-41	-111	-80	-152	-137	-150	-150	-150	-150	-150	
	Scheininjektionen		x	x	x	x	x	x	x	x	EOS					
<b>13003</b>	Visus	80	68	59	70	74	71	71	71	71	71	71	71	71	71	Gemäßigtes Ansprechen auf Lasertherapie, mäßiges Abflachen der Retina, verhaltener
	Visusunterschied zu V2	12	0	-9	2	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
	CRT	592	682	674	624	533	572	572	572	572	572	572	572	572	572	
	CRT-Unterschied zu V2	-90	0	-8	-58	-149	-110	-110	-110	-110	-110	-110	-110	-110	-110	

Laserarm		V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	Kommentar
	Scheininjektionen		x	x	x	x	EOS									Visusgewinn (3 Buchstaben)
21007	Visus	59	53	58	57	58	56	59	59	59	59	59	59	59	59	Gutes Ansprechen auf Lasertherapie (6 Buchstaben Gewinn), Abflachen der Retina ersichtlich
	Visusunterschied zu V2	6	0	5	4	5	3	6	6	6	6	6	6	6	6	
	CRT	399	388	415	373	364	294	332	332	332	332	332	332	332	332	
	CRT-Unterschied zu V2	11	0	27	-15	-24	-94	-56	-56	-56	-56	-56	-56	-56	-56	
	Scheininjektionen		x	x	x	x		EOS								
40001	Visus	48	50	61	59	63	63	63	63	63	63	63	63	63	63	Sehr gutes Ansprechen auf Laser Monotherapie (13 Buchstaben Gewinn und CRT Reduktion um 69µm)
	Visusunterschied zu V2	-2	0	11	9	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	
	CRT	507	493	416	452	424	424	424	424	424	424	424	424	424	424	
	CRT-Unterschied zu V2	14	0	-77	-41	-69	-69	-69	-69	-69	-69	-69	-69	-69	-69	
	Scheininjektionen		x	x	x	EOS										

**Tabelle 91 : Visusentwicklung und Retinadickenänderung unter Therapie bei den PDR Patienten im Laserarm mit Patientennummer, Visusverlauf, Visusunterschied zu Visite 2 (V2, Baseline), Verlauf der CRT (zentrale Retinadicke, vom Zentrum gemessen), CRT-Unterschied zu Visite 2 (V2, Baseline) inkl. Gabe von Injektionen; V=Visite, EOS=End of Study/Studienende für den jeweiligen Patienten**

Zu Kapitel 3.2.16.1 Biomarkerkonzentrationen der Patienten mit PDR:

		Visus				CRT				Injektionshäufigkeit			
		NPDR		PDR		NPDR		PDR		NPDR		PDR	
		Kombi- nation	Laser	Kombi- nation	Laser	Kombi- nation	Laser	Kombi- nation	Laser	Kombi- nation	Laser	Kombi- nation	Laser
Korrelation nach Spearman-Rho der Biomarkerkonzentration bei Baseline mit:		Unter- schied Visus V14 zu Visite 2 [n=57]	Unter- schied Visus V14 zu Visite 2 [n=32]	Unter- schied Visus V14 zu Visite 2 [n=18]	Unter- schied Visus V14 zu Visite 2 [n=5]	Unter- schied CRT V14 zu V2 [n=56]	Unter- schied CRT V14 zu V2 [n=32]	Unter- schied CRT V14 zu V2 [n=17]	Unter- schied CRT V14 zu V2 [n=5]	Anzahl Injektionen durch Visitenzahl [n=57]	Anzahl Injektionen durch Visitenzahl [n=32]	Anzahl Injektionen durch Visitenzahl [n=18]	Anzahl Injektionen durch Visitenzahl [n=5]
IL-8 [pg/ml]	KK	-0,102	-0,022	0,332	<b>-0,900*</b>	0,082	-0,321	-0,231	0,100	-0,055	<b>0,360*</b>	-0,430	0,224
	Signifikanz (2-seitig)	0,451	0,904	0,178	<b>0,037</b>	0,550	0,073	0,373	0,873	0,682	<b>0,043</b>	0,075	0,718
IL-10 [pg/ml]	KK	-0,077	-0,087	0,162	<b>-1,000**</b>	-0,118	-0,189	-0,094	-0,300	0,233	<b>0,352*</b>	-0,150	0,224
	Signifikanz (2-seitig)	0,570	0,635	0,520		0,386	0,301	0,720	0,624	0,081	<b>0,048</b>	0,554	0,718
IL-17A [pg/ml]	KK	0,042	0,060	0,401	-0,600	-0,247	-0,202	0,038	0,400	0,033	<b>0,422*</b>	-,556*	0,671
	Signifikanz (2-seitig)	0,758	0,743	0,099	0,285	0,067	0,267	0,884	0,505	0,806	<b>0,016</b>	0,017	0,215
MCP-1 [pg/ml]	KK	-0,164	-0,030	0,090	-0,600	0,143	0,133	-0,243	0,400	-0,037	-0,290	-0,099	0,671
	Signifikanz (2-seitig)	0,222	0,870	0,723	0,285	0,294	0,469	0,348	0,505	0,787	0,108	0,697	0,215
VEGF [pg/ml]	KK	0,204	0,143	-0,107	-0,200	0,076	-0,012	-0,287	0,300	0,048	0,140	-0,054	0,783
	Signifikanz (2-seitig)	0,128	0,436	0,671	0,747	0,578	0,949	0,264	0,624	0,721	0,445	0,831	0,118
Apo-AI [µg/ml]	KK	0,080	-0,311	<b>-0,623**</b>	0,600	-0,132	0,005	0,137	0,100	-0,068	0,262	0,245	<b>-0,894*</b>
	Signifikanz (2-seitig)	0,556	0,083	<b>0,006</b>	0,285	0,332	0,980	0,599	0,873	0,614	0,148	0,327	<b>0,041</b>
Apo-AII [µg/ml]	KK	0,008	-0,280	<b>-0,521*</b>	-0,700	-0,219	-0,087	0,338	-0,500	-0,153	<b>0,357*</b>	0,055	-0,447
	Signifikanz (2-seitig)	0,952	0,120	<b>0,027</b>	0,188	0,104	0,638	0,184	0,391	0,254	<b>0,045</b>	0,828	0,450



Apo-B [µg/ml]	KK	-0,057	-0,203	-0,339	-0,600	<b>-0,273*</b>	0,023	0,344	-0,600	-0,087	0,249	-0,053	-0,224
	Signifikanz (2-seitig)	0,672	0,266	0,169	0,285	<b>0,042</b>	0,901	0,177	0,285	0,520	0,170	0,834	0,718
Apo-CII [µg/ml]	KK	0,003	-0,269	-0,459	-0,300	-0,237	-0,069	0,206	-0,700	-0,123	<b>0,361*</b>	0,033	-0,224
	Signifikanz (2-seitig)	0,980	0,136	0,056	0,624	0,078	0,709	0,428	0,188	0,364	<b>0,043</b>	0,896	0,718
Apo-CIII [µg/ml]	KK	-0,128	-0,231	-0,056	-0,800	-0,155	-0,127	0,017	-0,700	-0,005	<b>0,365*</b>	-0,111	0,112
	Signifikanz (2-seitig)	0,344	0,203	0,824	0,104	0,254	0,489	0,948	0,188	0,973	<b>0,040</b>	0,662	0,858
Apo-E [µg/ml]	KK	0,018	-0,238	-0,325	-0,500	<b>-0,301*</b>	-0,072	0,189	-0,600	-0,110	0,334	0,016	-0,671
	Signifikanz (2-seitig)	0,893	0,189	0,188	0,391	<b>0,024</b>	0,695	0,468	0,285	0,413	0,062	0,951	0,215
sVCAM-1 [ng/ml]	KK	0,094	0,001	-0,256	0,700	0,221	0,172	0,096	0,500	0,114	-0,138	0,401	0,447
	Signifikanz (2-seitig)	0,488	0,996	0,305	0,188	0,102	0,347	0,715	0,391	0,400	0,451	0,099	0,450
sICAM-1 [ng/ml]	KK	0,068	0,031	-0,270	0,700	0,114	0,203	0,005	0,500	0,085	-0,271	0,362	0,447
	Signifikanz (2-seitig)	0,615	0,868	0,279	0,188	0,402	0,265	0,985	0,391	0,531	0,134	0,139	0,450
IL-6 [pg/ml]	KK	0,063	-0,108	-0,025	0,600	0,004	0,306	0,049	0,100	-0,066	-0,257	0,290	0,447
	Signifikanz (2-seitig)	0,640	0,555	0,922	0,285	0,974	0,088	0,852	0,873	0,624	0,156	0,244	0,450
* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.													
** . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.													

Tabelle 92: Zweiseitiger Korrelationstest nach Pearson auf dem 95 % Niveau; betrachtet werden die Faktoren Biomarkerkonzentration an Visite 1 und Visusänderung zwischen Baseline und Visite 14; fett markierte und mit einem \* versehene Korrelationen sind signifikant; V1/2: Visite 1/2; (N)PDR: (nicht) proliferative diabetische Retinopathie;

### Zu Kapitel 3.2.16.4 Verteilung der Ischämiegrade und Biomarkerkonzentrationen an Visite 1:

Biomarkerkonzentration bei Visite 1 aufgeteilt nach Stadien der Makulaischämie (Kapillarverlust in Feld 9) (n=78)																					
	nicht vorhanden (n=2)				fraglich (n=12)				vorhanden (n=35)				moderat (n=20)				schwer (n=9)				p-Wert
	Mittelwert ± SD		Median		Mittelwert ± SD		Median		Mittelwert ± SD		Median		Mittelwert ± SD		Median		Mittelwert ± SD		Median		
<b>IL-8</b>	12,6	±	4,3	12,6	19,2	±	12,3	20,1	23,0	±	64,4	10,1	14,9	±	10,3	14,1	14,6	±	16,3	8,3	0,511
<b>IL-10</b>	8,7	±	8,4	8,7	5,6	±	4,6	6,2	3,6	±	4,1	1,0	5,5	±	7,7	1,3	2,2	±	2,6	1,0	0,431
<b>IL-17A</b>	4,7	±	5,3	4,7	12,5	±	17,1	5,2	25,2	±	92,2	0,8	9,8	±	21,7	0,3	0,6	±	0,6	0,3	0,117
<b>MCP-1*</b>	539,4	±	145,0	539,4	751,8	±	246,8	762,2	503,5	±	256,7	452,9	664,7	±	551,6	517,2	846,2	±	503,8	595,9	<b>0,032*</b>
<b>VEGF</b>	1301,1	±	1316,7	1301,1	677,6	±	264,1	719,8	589,2	±	492,1	511,8	565,0	±	342,7	528,8	499,9	±	326,5	473,4	0,613
<b>Apo-AI</b>	2945,9	±	1244,3	2945,9	1630,7	±	1441,5	1034,1	2014,7	±	1912,7	1675,0	2494,7	±	2086,6	1958,9	1942,1	±	1043,3	1938,3	0,302
<b>Apo-AII</b>	1822,6	±	1676,3	1822,6	1141,9	±	1392,8	448,3	873,9	±	773,2	663,1	1166,0	±	1336,7	639,2	657,7	±	426,3	543,4	0,742
<b>Apo-B</b>	289,5	±	159,9	289,5	294,5	±	386,9	129,1	704,9	±	1248,4	193,5	527,3	±	740,7	227,5	331,6	±	511,1	142,4	0,882
<b>Apo-CII</b>	562,1	±	652,4	562,1	579,4	±	918,7	91,3	322,8	±	464,2	136,0	388,5	±	720,5	106,9	145,9	±	94,9	192,2	0,913
<b>Apo-CIII</b>	3608,4	±	4750,0	3608,4	9551,4	±	15912,8	819,1	5152,3	±	9047,7	507,0	5114,3	±	12708,4	346,1	1854,5	±	2628,9	751,5	0,857
<b>Apo-E</b>	661,7	±	771,7	661,7	386,1	±	667,4	83,3	196,0	±	252,6	98,7	262,0	±	368,1	96,6	95,2	±	63,6	92,6	0,667
<b>sVCAM-1</b>	947,2	±	1308,6	947,2	943,2	±	581,4	1137,8	1566,0	±	1115,4	1299,3	2093,0	±	1382,8	1714,3	1675,9	±	826,1	1362,0	0,097
<b>sICAM-1</b>	102,9	±	139,6	102,9	94,6	±	52,0	104,8	158,6	±	134,2	120,7	194,7	±	121,8	161,6	164,2	±	74,8	147,6	0,091
<b>IL-6</b>	2,7	±	3,3	2,7	2,6	±	2,6	2,0	2,2	±	1,6	1,5	2,1	±	1,6	1,8	2,8	±	2,3	2,3	0,934

Tabelle 93: Biomarkerkonzentrationen aufgeteilt nach Ischämiegrad (Kapillarverlust in Feld 9) bei Visite 1; Dargestellt sind Mittelwert mit Standardabweichung (SD) und Median; \*signifikanter Unterschied zwischen Biomarkerkonzentration an Visite 1 und dem Ischämie stadium (Kruskal-Wallis Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau).

Zu Kapitel 3.2.17: Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und weiteren Baselinewerten (Visus, zentrale Retinadicke)

Serumkonzentration an Visite 1; Spearman-Rho Test		BCVA an V1 [ETDRS Buchstaben] (n=114)	BCVA an V2 [ETDRS Buchstaben]	CRT vom Zentrum gemessen V1 [ $\mu\text{m}$ ] (n=113)	CRT vom Zentrum gemessen V2 [ $\mu\text{m}$ ] (n=112)	FCP Baseline [ $\mu\text{m}$ ] (n=101)	CSMT Baseline [ $\mu\text{m}$ ] (n=101)	HbA1c an V1 [%] (n=114)	Alter V1 (n=114)	Zeit seit DMÖ Diagnose in Monaten (n=113)
IL-8 [pg/ml]	KK	-0,077	-0,074	0,010	0,031	0,004	0,030	0,083	0,029	-0,035
	Sig. (2-seitig)	0,414	0,431	0,914	0,744	0,968	0,769	0,381	0,756	0,710
IL-10 [pg/ml]	KK	-0,029	-0,007	0,079	0,068	-0,004	0,060	0,011	0,074	-0,061
	Sig. (2-seitig)	0,758	0,941	0,403	0,474	0,968	0,548	0,907	0,436	0,520
IL-17A [pg/ml]	KK	-0,066	-0,050	<b>0,193*</b>	0,178	0,168	<b>0,239*</b>	0,010	-0,030	-0,009
	Sig. (2-seitig)	0,486	0,598	<b>0,041</b>	0,061	0,094	<b>0,016</b>	0,913	0,751	0,921
MCP-1 [pg/ml]	KK	0,090	0,144	<b>-0,206*</b>	<b>-0,220*</b>	<b>-0,206*</b>	-0,187	0,037	-0,064	-0,016
	Sig. (2-seitig)	0,343	0,126	<b>0,028</b>	<b>0,020</b>	<b>0,039</b>	0,061	0,699	0,499	0,865
VEGF [pg/ml]	KK	-0,133	-0,138	0,041	0,061	0,017	0,010	0,007	<b>-0,195*</b>	-0,083
	Sig. (2-seitig)	0,158	0,143	0,663	0,520	0,867	0,918	0,945	<b>0,038</b>	0,381
Apo-AI [ $\mu\text{g/ml}$ ]	KK	0,097	0,025	-0,092	-0,120	-0,151	-0,102	0,080	0,083	-0,029
	Sig. (2-seitig)	0,305	0,794	0,334	0,206	0,131	0,309	0,399	0,381	0,764
Apo-AII [ $\mu\text{g/ml}$ ]	KK	0,154	0,086	-0,017	-0,028	-0,109	-0,032	0,114	-0,056	-0,048
	Sig. (2-seitig)	0,103	0,363	0,857	0,772	0,279	0,749	0,226	0,553	0,614

Serumkonzentration an Visite 1; Spearman-Rho Test		BCVA an V1 [ETDRS Buchstaben] (n=114)	BCVA an V2 [ETDRS Buchstaben]	CRT vom Zentrum gemessen V1 [µm] (n=113)	CRT vom Zentrum gemessen V2 [µm] (n=112)	FCP Baseline [µm] (n=101)	CSMT Baseline [µm] (n=101)	HbA1c an V1 [%] (n=114)	Alter V1 (n=114)	Zeit seit DMÖ Diagnose in Monaten (n=113)
Apo-B [µg/ml]	KK	0,034	-0,050	-0,002	0,017	0,005	0,077	0,183	0,073	-0,163
	Sig. (2-seitig)	0,721	0,596	0,987	0,862	0,958	0,442	0,051	0,438	0,084
Apo-CII [µg/ml]	KK	0,136	0,079	-0,050	-0,045	-0,149	-0,080	0,123	-0,013	-0,056
	Sig. (2-seitig)	0,149	0,403	0,597	0,639	0,138	0,425	0,193	0,892	0,555
Apo-CIII [µg/ml]	KK	0,087	0,042	0,103	0,126	-0,050	0,014	0,011	-0,136	-0,076
	Sig. (2-seitig)	0,355	0,660	0,278	0,184	0,621	0,889	0,909	0,150	0,424
Apo-E [µg/ml]	KK	0,135	0,070	0,006	0,011	-0,084	-0,001	0,098	0,017	-0,072
	Sig. (2-seitig)	0,153	0,462	0,952	0,909	0,404	0,990	0,299	0,857	0,448
sVCAM-1 [ng/ml]	KK	-0,025	0,058	-0,156	<b>-0,204*</b>	-0,103	-0,182	-0,001	<b>0,185*</b>	0,136
	Sig. (2-seitig)	0,793	0,543	0,100	<b>0,031</b>	0,304	0,069	0,989	<b>0,049</b>	0,149
sICAM-1 [ng/ml]	KK	-0,032	0,027	-0,128	-0,171	-0,089	-0,162	-0,015	0,128	0,153
	Sig. (2-seitig)	0,737	0,772	0,176	0,071	0,375	0,105	0,876	0,174	0,106
IL-6 [pg/ml]	KK	-0,014	0,040	<b>-0,208*</b>	<b>-0,226*</b>	-0,131	-0,192	-0,022	0,052	0,029
	Sig. (2-seitig)	0,880	0,670	<b>0,027</b>	<b>0,016</b>	0,192	0,054	0,819	0,585	0,763

Tabelle 94: Überblick über die Korrelation von Biomarkerkonzentration an mit Visus an Visite 1 und 2, Zentrale Retinadicke vom Zentrum gemessen an Visite 1 und 2, Foveal Center Point, Central Subfield Mean Thickness, HbA1c und Alter; \*Korrelation ist auf dem 95 % Niveau signifikant (zweiseitig); VA: bestkorrigierter Visus; CRT: central retinal thickness-zentrale Retinadicke; FCP: Foveal Center Point; CSMT: Central Subfield Mean Thickness; KK: Korrelationskoeffizient; V: Visite

Zu Kapitel 3.2.17 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und weiteren Baselinewerten (Visus, zentrale Retinadicke):

Biomarkerkonzentration an Visite 1	Männlich (n=71)				Weiblich (n=43)				p-Wert*
	Mittelwert	±	SD	Median	Mittelwert	±	SD	Median	
IL-8	13,061	±	9,335	10,887	24,992	±	58,249	13,480	0,246
IL-10	4,351	±	5,789	0,995	4,952	±	6,792	1,173	0,403
IL-17A	5,453	±	11,143	0,325	23,305	±	83,966	0,963	0,129
MCP-1	605,258	±	388,474	531,630	586,668	±	331,036	453,730	0,886
VEGF	611,805	±	502,267	518,357	685,883	±	530,335	529,230	0,500
Apo-AI	2006,648	±	1448,137	1691,700	2028,759	±	1934,505	1718,900	0,676
Apo-AII	961,828	±	903,256	659,500	965,308	±	1181,615	596,100	0,520
Apo-B	435,217	±	795,322	170,700	643,310	±	984,099	211,750	0,591
Apo-CII	392,886	±	660,690	121,900	346,069	±	569,848	111,600	0,706
Apo-CIII	4276,555	±	9083,244	481,100	6818,240	±	12746,784	495,300	0,974
Apo-E	231,986	±	379,214	102,100	214,731	±	288,984	95,800	0,951
sVCAM-1	1676,748	±	1085,120	1458,122	1848,901	±	1329,882	1580,672	0,611
sICAM-1	163,287	±	103,730	143,688	190,026	±	173,548	153,781	0,781
IL-6	2,992	±	2,752	2,223	2,027	±	1,383	1,628	0,126

Tabelle 95: Verteilung der Biomarker Serumkonzentrationen nach Geschlecht. SD: Standardabweichung; \*Signifikanztest berechnet mit dem Mann-Whitney-U Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau

Zu Kapitel 3.2.17 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen bei Baseline und weiteren Baselinewerten (Visus, zentrale Retinadicke):

Biomarkerkonzentration an Visite 1	Typ 1 Diabetiker (n=13)				Typ 2 Diabetiker (n=101)				p-Wert
	Mittelwert	±	SD	Median	Mittelwert	±	SD	Median	
IL-8	46,236	±	103,876	16,450	13,871	±	10,425	12,140	0,276
IL-10	3,488	±	3,749	0,963	4,718	±	6,409	1,165	0,681
IL-17A	50,804	±	149,252	0,573	7,216	±	15,537	0,465	0,397
MCP-1	562,919	±	299,950	544,570	602,793	±	375,203	497,720	0,911
VEGF	708,441	±	586,105	557,255	630,905	±	504,255	518,357	0,659
Apo-AI	1930,438	±	1328,662	1678,100	2025,871	±	1681,363	1718,900	0,947
Apo-AII	1044,935	±	1030,679	618,200	952,613	±	1014,429	636,900	0,659
Apo-B	576,946	±	828,887	136,700	505,568	±	882,093	179,000	0,643
Apo-CII	456,288	±	820,708	90,200	364,793	±	600,615	123,500	0,799
Apo-CIII	6971,825	±	12124,269	2364,100	5011,742	±	10471,073	481,100	0,256
Apo-E	276,173	±	580,079	70,700	218,952	±	308,319	102,000	0,834
sVCAM-1	1859,235	±	1672,891	1157,289	1726,552	±	1112,262	1573,754	0,698
sICAM-1	206,596	±	215,886	152,072	169,097	±	120,908	146,229	0,755
IL-6	2,594	±	2,522	1,440	2,632	±	2,364	1,925	0,608

Tabelle 96: Verteilung der Biomarker Serumkonzentrationen nach Diabetestyp. SD: Standardabweichung; \*Signifikanztest berechnet mit dem Mann-Whitney-U Test unabhängiger Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau

### Zu Kapitel 3.2.18 Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen und Begleittherapien

Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]	Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]	Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]
Insulin Human	68	59,65	Calcium	3	2,63	Citalopram	1	0,88
Metformin	61	53,51	Captopril	3	2,63	Clonidin	1	0,88
ASS	46	40,35	Clopidogrel	3	2,63	Clonidin Augentropfen	1	0,88
Simvastatin	43	37,72	Dexamethason Augentropfen	3	2,63	Dihydrocodein 6 Wochen	1	0,88
Ramipril	36	31,58	Dorzolamid Augentropfen	3	2,63	Domperidon 1 Monat	1	0,88
Hydrochlorothiazid (HCT)	30	26,32	Furosemid	3	2,63	Doxazosin	1	0,88
Insulin glargin	22	19,30	Irbesartan	3	2,63	Duloxetin	1	0,88
Bisoprolol	20	17,54	Nifedipin	3	2,63	Eisen-2-sulfat	1	0,88
Amlodipin	19	16,67	Novaminsulfon	3	2,63	Endolaser Partnerauge	1	0,88
Laser Partnerauge	19	16,67	OP_Zahn	3	2,63	Ezetimib	1	0,88
Metoprolol	18	15,79	Pravastatin	3	2,63	Felodipin	1	0,88
Enalapril	16	14,04	Pregabalin	3	2,63	Finasterid	1	0,88
Ranibizumab Partnerauge	17	14,91	Tamsulosin	3	2,63	Fometerol oral Asthma	1	0,88
Glimepirid	15	13,16	Telmisartan	3	2,63	Gliclazid	1	0,88
OP systemisch	14	12,28	Tilidin	3	2,63	Haloperidol	1	0,88
Sitagliptin	14	12,28	Triamteren	3	2,63	Hydromorphon 6 Monate	1	0,88
Timolol Augentropfen	12	10,53	Uradipil	3	2,63	Isosorbitmononitrat (ISMN)	1	0,88
Torasemid	12	10,53	ACC	2	1,75	Kaliumiodid	1	0,88
Insulinaspartat	11	9,65	Amitryptilin	2	1,75	Lamotrigin	1	0,88
Allopurinol	10	8,77	Atenolol	2	1,75	Levodopa	1	0,88
Bevacizumab	10	8,77	Brimonidin okular	2	1,75	Liponsäure	1	0,88

Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]	Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]	Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]
Partnerauge								
Ibuprofen mindestens 2 Wochen bis Dauertherapie	10	8,77	Carbamazepin	2	1,75	Lormetazepam	1	0,88
OP Partnerauge	10	8,77	Celiprolol	2	1,75	Lorsartan	1	0,88
Candesartan	9	7,89	Ceterizin	2	1,75	Metamizol	1	0,88
Omeprazol	9	7,89	Cilostazol	2	1,75	Mirtazapin	1	0,88
Detemir (Insulin analogon)	7	6,14	Diclofenac Dauertherapie	2	1,75	Naftidrofuryl	1	0,88
Gilbenclamid	7	6,14	Gentamicin Augentropfen 2 Wochen	2	1,75	Naloxon	1	0,88
Lercandipin	6	5,26	Insulin Lispro	2	1,75	Neomycinsulfat Augentropfen 2 Wochen	1	0,88
Lisinopril	6	5,26	Isosorbitdinitrat (ISDN)	2	1,75	Orlistat	1	0,88
Pantoprazol	6	5,26	Kryokoagulation Partnerauge	2	1,75	Oxybutynin	1	0,88
Pioglitazon	6	5,26	Lantanoprost Augentropfen	2	1,75	Pentoxyfyllin	1	0,88
Repaglinid	6	5,26	Liraglutid	2	1,75	Perindopril	1	0,88
Triamcinolon Partnerauge	5	4,39	Molsidomin	2	1,75	Pipamperon	1	0,88
Aliskiren	5	4,39	Nebivolol	2	1,75	Piracetam	1	0,88
Carvedilol	5	4,39	Ofloxacin Augentropfen Dauermedikation	2	1,75	Polymyxin und Isopto 2 Wochen Augentropfen	1	0,88
Gabapentin	5	4,39	Opipramol	2	1,75	Polystyroldivinylbenzolsulfonsäure	1	0,88
Moxonidin	5	4,39	Pentaerythrittrinitrat	2	1,75	Prednisolon Augentropfen 3 Wochen	1	0,88
Nitrendipin	5	4,39	Spironolacton	2	1,75	Prednisolon	1	0,88



Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]		Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]		Therapie	Anzahl	Häufigkeit [%]
								systemisch, Dauertherapie		
Olmesartan	5	4,39		Tramadol	2	1,75		Propranolol	1	0,88
Panretinallaser Partnerauge	5	4,39		Trimipramin	2	1,75		Protease 2 Monate	1	0,88
Phenprocoumon	5	4,39		Verapamil	2	1,75		Sultamicillin 1 Monat	1	0,88
Thyroxin	5	4,39		Vildagliptin	2	1,75		Tapentadol	1	0,88
Valsartan	5	4,39		Alendronsäure	1	0,88		Theophyllin	1	0,88
Xipamid	5	4,39		Amiodaron	1	0,88		Thiamazol	1	0,88
Azetazolamid	4	3,51		Atorvastatin	1	0,88		Travoprost Augentropfen	1	0,88
Colecalciferol	4	3,51		Azathioprin	1	0,88		Triamcinolon 3mal Intramusculär	1	0,88
Glyceroltrinitrat	4	3,51		Benfotiamin	1	0,88		Ursodeoxycholsäure	1	0,88
Indapamid	4	3,51		Bisacodyl Dauermedikation	1	0,88		Vardenafil	1	0,88
Insulinglulisin	4	3,51		Budesonid Inhalation	1	0,88		Venlafaxin	1	0,88
Levothyroxin	4	3,51		Bupropion	1	0,88		Vitamin B12	1	0,88
Magnesium	4	3,51		Carbidopa	1	0,88		Vitamin E wg. Avitaminose	1	0,88
Brinzolamid Augentropfen	3	2,63								

Tabelle 97: Begleitmedikationen der RELATION Patienten nach absteigender Häufigkeit; AT: Augentropfen; IM: Intramusculär

Medikamenten- gruppe	Insulin (mind. 1)	Human- insulin	Antidia- betiku m	Sulfonyl- harnstoffe	Metformin	Lipid- senker	Statine	RAAS	ACE- Hemmer	Ramipril	Beta- blocker	Metoprolol	Sartane
Anzahl Patienten	82	68	69	23	61	47	46	82	61	36	49	18	25
Häufigkeit [%]	71,90	59,65	60,50	20,20	53,51	41,23	40,40	71,90	53,50	31,58	43,00	15,79	21,90
IL-8	0,180	0,009	0,240	0,217	0,412	0,879	0,872	0,648	0,664	0,16	0,075	0,017	0,853
IL-10	0,055	0,008	0,825	0,342	0,791	0,972	0,972	0,331	0,427	0,085	0,172	0,03	0,427
IL-17	0,745	0,442	0,344	0,620	0,900	0,652	0,549	0,214	0,034	0,003	0,352	0,344	0,611
MCP-1	0,682	0,599	0,128	0,069	0,880	0,213	0,239	0,641	0,753	0,789	0,888	0,514	0,263
VEGF	0,755	0,85	0,170	0,691	0,174	0,406	0,406	0,714	0,507	0,94	0,622	0,775	0,720
Apo-AI	0,142	0,575	0,234	0,813	0,084	0,536	0,456	0,183	0,925	0,903	0,106	0,56	0,038
Apo-AII	0,813	0,346	0,442	0,446	0,490	0,758	0,640	0,179	0,714	0,47	0,268	0,807	0,097
Apo-B	0,295	0,89	0,546	0,163	0,249	0,827	0,701	0,043	0,356	0,667	0,137	0,652	0,037
Apo-CII	0,654	0,453	0,754	0,202	0,856	0,741	0,673	0,190	0,382	0,319	0,321	0,981	0,334
Apo-CIII	0,762	0,54	0,919	0,890	0,380	0,723	0,636	0,729	0,512	0,252	0,920	0,234	0,535
Apo-E	0,875	0,396	0,514	0,275	0,615	0,776	0,640	0,171	0,380	0,223	0,281	0,828	0,170
sVCAM-1	0,813	0,414	0,568	0,918	0,492	0,881	0,788	0,431	0,712	0,857	0,481	0,652	0,612
sICAM-1	0,935	0,383	0,901	0,680	0,198	0,986	0,956	0,330	0,601	0,777	0,234	0,314	0,740
IL-6	0,798	0,615	0,799	0,308	0,241	0,782	0,984	0,468	0,272	0,824	0,952	0,442	0,343
Medikamente	Insulin- glargin		Gilbenci- amid	Alendron- säure		Statine	Ator- vastatin	Aliskiren	Captopril		Atenolol		Candesartan
	Insulin- glulisin		Gliclazid	Gilben- clamid			Orlistat	Pravastatin	Candesartan	Enalapril	Bisoprolol		Irbesartan
	Human- insulin		Glime- pirid	Gliclazid			Eze- timib	Sim- vastatin	Irbesartan	Lisinopril	Carvedilol		Lorsartan
	Insulin- lispro		Repa- glinid	Glimepirid					Lorsartan	Ramipril	Celiprolol		Olmesartan
	Insulin- aspartat		Pioglitaz- on						Olmesartan	Perindopril	Metoprolol		Telmisartan

Medikamenten- gruppe	Insulin (mind. 1)	Human- insulin	Antidia- betiku m	Sulfonyl- harnstoffe	Metformin	Lipid- senker	Statine	RAAS	ACE- Hemmer	Ramipril	Beta- blocker	Metoprolol	Sartane
	Detemir (Insulin analogon)		Rosi- glitazon					Telmisartan			Nebivolol		Valsartan
			Met- formin					Valsartan			Propranolol		
			Lira- glutid					Captopril					
			Sita- gliptin					Enalapril					
			Vilda- gliptin					Lisinopril					
								Ramipril					
								Perindopril					

**Tabelle 98: Häufigkeiten der gängigsten Medikamentengruppen und p-Werte des Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau. Signifikante p-Werte sind gelb hinterlegt.**

Medikamentengruppe	Blutgerinnung	Schmerztherapie	Schilddrüse	Antidepressiva	Diuretikum	Hydrochlorothiazid	NO-Freisetzer	Ca-Kanalhemmer	Allopurinol
Anzahl Patienten	51	22	10	7	50	30	7	33	10
Häufigkeit [%]	44,70	19,30	8,80	6,20	43,90	26,32	6,10	28,90	8,77
IL-8	0,795	0,486	0,452	0,553	0,379	0,069	0,897	0,800	0,319
IL-10	0,415	0,679	0,350	0,702	0,490	0,72	0,700	0,975	0,308
IL-17	0,058	0,947	0,177	0,774	<b>0,006</b>	0,053	0,710	0,494	0,942
MCP-1	0,930	0,937	0,638	0,808	0,977	0,285	0,270	0,781	0,841
VEGF	0,614	0,481	0,977	0,927	0,076	<b>0,004</b>	0,725	0,838	0,434
Apo-AI	0,630	0,336	<b>0,026</b>	0,181	0,673	0,483	0,250	0,724	0,689
Apo-AII	0,310	0,252	<b>0,011</b>	0,462	0,668	0,587	0,088	0,726	0,496
Apo-B	0,602	0,391	<b>0,019</b>	0,402	0,751	0,797	0,060	0,316	0,432
Apo-CII	0,445	0,083	0,123	0,536	0,578	0,477	0,063	0,771	0,284
Apo-CIII	0,563	0,318	0,222	0,759	0,560	0,263	<b>0,047</b>	0,893	0,771
Apo-E	0,382	0,366	0,058	0,486	0,995	0,503	<b>0,043</b>	0,958	0,362
sVCAM-1	0,514	0,943	0,733	0,294	0,417	0,221	0,763	0,698	0,176
sICAM-1	0,201	0,914	0,634	0,373	0,467	0,406	0,920	0,510	0,745
IL-6	0,608	0,846	0,528	0,611	0,813	0,767	0,231	0,169	<b>0,002</b>
Medikamente		Diclofenac permanent	Kaliumiodid T	Amitriptylin	Furosemid		Glyceroltrinitrat	Amlodipin	
	Phenprocoumon	Hydromorphon 6 Monate	Levothyroxin	Bupropion	Torasemid		Isosorbiddinitrat ISDN	Felodipin	
	ASS	Dihydrocodein 6 Wochen	Thiamazol	Citalopram	Hydrochlorothiazid HCT		Isosorbithmononitrat ISMN	Lercandipin	
		Ibuprofen mind. 2 Wochen oder Dauertherapie	Thyroxin	Duloxetin	Indapamid		Molsidomin	Nifedipin	
		Indometacin		Venlafaxin	Xipamid		Penta-erythrit-trinitrat	Nitrendipin	
		Metamizol		Mirtazapin	Spirolacton			Verapamil	

Medikamentengruppe	Blutgerinnung	Schmerztherapie	Schilddrüse	Antidepressiva	Diuretikum	Hydrochlorothiazid	NO-Freisetzer	Ca-Kanalhemmer	Allopurinol
		Tilidin			Triamteren				
		Tramadol							
		Novaminsulfon							
		Naloxon							
		Oxybutynin							
		Tapentadol							

Tabelle 99: Häufigkeiten der gängigsten Medikamentengruppen und p-Werte des Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben auf dem 95 % Signifikanzniveau. Signifikante p-Werte sind gelb hinterlegt. Bei den Avastin-Patienten wurde nicht die Konzentration an Visite 1 sondern an Visite 6 und 14 betrachtet.

Mediane signifikanter Therapien		RAAS-Einnahme		Sartan-Therapie		ACE-Hemmer-Gabe		Ramipril-Gabe		Bisoprolol-Einnahme		Metoprolol-Gabe	
		nein	ja	Nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja
<b>IL-8</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>13,11</b>	<b>7,18</b>
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>19,19</b>	<b>8,90</b>
<b>IL-10</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>1,20</b>	<b>0,86</b>
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>4,95</b>	<b>2,60</b>
<b>IL-17</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,96</b>	<b>0,33</b>	<b>0,96</b>	<b>0,33</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>9,97</b>	<b>14,11</b>	<b>15,61</b>	<b>4,77</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-AI</b>	Median	n.s.	n.s.	<b>1910,80</b>	<b>1253,60</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>1763,80</b>	<b>1123,63</b>	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	<b>2124,94</b>	<b>1623,56</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>2158,30</b>	<b>1341,41</b>	n.s.	n.s.
<b>Apo-B</b>	Median	<b>293,65</b>	<b>128,25</b>	<b>193,40</b>	<b>91,80</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	<b>656,42</b>	<b>458,02</b>	<b>552,40</b>	<b>375,95</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 100: Mittelwerte und Mediane der Biomarkerkonzentrationen bei signifikanten Unterschieden zwischen Therapie und keiner Therapie; nicht signifikante Werte sind nicht angegeben in der Tabelle sondern mit n.s. markiert.

	Mediane signifikanter Therapien	Therapie mit NO-Freisetzern		Diuretika-Therapie (mind. 1)		Hydrochlorothiazid-Gabe		Einnahme von Schilddrüsenmedikamenten		Gabe von Humaninsulin		Einnahme von Allopurinol	
		nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja
<b>IL-8</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>16,26</b>	<b>9,34</b>	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>17,21</b>	<b>17,80</b>	n.s.	n.s.
<b>IL-10</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>5,06</b>	<b>0,96</b>	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>5,81</b>	<b>3,74</b>	n.s.	n.s.
<b>IL-17</b>	Median	n.s.	n.s.	<b>1,51</b>	<b>0,33</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	<b>11,15</b>	<b>13,51</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>VEGF</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>614,26</b>	<b>337,60</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>733,31</b>	<b>419,10</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-AI</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>1784,55</b>	<b>892,35</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>2102,52</b>	<b>1104,64</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-AII</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>1019,71</b>	<b>374,77</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>663,10</b>	<b>331,10</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-B</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>193,40</b>	<b>69,75</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>547,59</b>	<b>161,38</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-CIII</b>	Median	<b>493,10</b>	<b>204,20</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	<b>5550,69</b>	<b>413,73</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Apo-E</b>	Median	<b>102,10</b>	<b>38,10</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mittelwert	<b>236,31</b>	<b>59,93</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>IL-6</b>	Median	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>1,79</b>	<b>4,16</b>
	Mittelwert	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>2,33</b>	<b>5,78</b>

Tabelle 101: Mittelwerte und Mediane der Biomarkerkonzentrationen bei signifikanten Unterschieden zwischen Therapie und keiner Therapie; nicht signifikante Werte sind nicht angegeben in der Tabelle sondern mit *n.s.* markiert.

Zu Kapitel 3.2.19: Einfluss der Biomarkerkonzentrationen bei Baseline auf das Outcome

Konzentration an Visite 1 Kombinationsarm	Spearman-Rho Test	Quotient Injektionszahl-Visitenzahl (n=76)	Visusänderung von V2 zu V6 [ETDRS Buchstaben] (n=76)	Visusänderung von V2 zu V14 [ETDRS Buchstaben] (n=76)	Quotient Injektionszahl-Visitenzahl n=38	Visusänderung von V2 zu V6 [ETDRS Buchstaben] (n=38)	Visusänderung von V2 zu V14 [ETDRS Buchstaben] (n=38)
IL-8 [pg/ml]	KK	-0,143	-0,059	0,032	<b>0,366</b> *	0,071	-0,092
	Sig. (2-seitig)	0,218	0,611	0,787	0,024	0,673	0,581
IL-10 [pg/ml]	KK	0,134	0,006	0,005	<b>0,335</b> *	0,099	-0,149
	Sig. (2-seitig)	0,248	0,961	0,965	0,04	0,553	0,373
IL-17A [pg/ml]	KK	-0,09	0,091	0,089	<b>0,430</b> **	0,033	-0,024
	Sig. (2-seitig)	0,438	0,437	0,443	0,007	0,842	0,888
MCP-1 [pg/ml]	KK	-0,056	-0,054	-0,065	-0,264	0,058	-0,096
	Sig. (2-seitig)	0,63	0,642	0,578	0,11	0,729	0,568
VEGF [pg/ml]	KK	0,039	0,126	0,094	0,197	-0,051	0,119
	Sig. (2-seitig)	0,74	0,277	0,421	0,236	0,759	0,477
Apo-AI [µg/ml]	KK	0,014	-0,021	-0,045	0,163	-0,108	-0,229
	Sig. (2-seitig)	0,902	0,857	0,699	0,329	0,517	0,167
Apo-AII [µg/ml]	KK	-0,087	-0,053	-0,111	0,296	-0,108	-0,304
	Sig. (2-seitig)	0,456	0,649	0,340	0,071	0,520	0,064
Apo-B [µg/ml]	KK	-0,062	-0,017	-0,079	0,168	-0,160	-0,133
	Sig. (2-seitig)	0,593	0,882	0,498	0,313	0,339	0,425
Apo-CII [µg/ml]	KK	-0,063	-0,067	-0,086	0,248	-0,196	-0,299
	Sig. (2-seitig)	0,588	0,564	0,459	0,133	0,237	0,068
Apo-CIII [µg/ml]	KK	-0,002	-0,111	-0,125	<b>0,340</b> *	-0,117	-0,238
	Sig. (2-seitig)	0,989	0,338	0,282	0,037	0,486	0,151
Apo-E [µg/ml]	KK	-0,06	0,003	-0,029	0,262	-0,183	-0,249
	Sig. (2-seitig)	0,604	0,981	0,805	0,112	0,270	0,131
sVCAM-1 [ng/ml]	KK	0,178	-0,036	0,003	-0,128	-0,047	0,126
	Sig. (2-seitig)	0,125	0,760	0,977	0,443	0,778	0,450
sICAM-1 [ng/ml]	KK	0,132	-0,086	-0,022	-0,243	0,043	0,118
	Sig. (2-seitig)	0,254	0,461	0,850	0,142	0,800	0,479
IL-6 [pg/ml]	KK	0,039	0,018	0,030	-0,208	-0,086	0,050
	Sig. (2-seitig)	0,738	0,877	0,799	0,211	0,608	0,766

Tabelle 102: Übersicht der Spearman-Rho Tests auf Korrelation Behandlungsquotient, Visusänderung Visite 6 und Visite 14; Betrachtet wird die Korrelation des Injektion/Visitenquotienten mit der Konzentration der Biomarker an Visite 1. Der Quotient gibt die Injektionshäufigkeit pro Visite an. Je näher an 1 desto häufiger wurde injiziert, was

auch ein Maß für das Therapieansprechen darstellt. Außerdem wird die Korrelation der Visite 1 Biomarkerkonzentration mit Visusänderung von Baseline zu Visite 6 und 14 betrachtet. KK: Korrelationskoeffizient

		Kombinationsgruppe						Laserguppe					
Serumkonzentration an Visite 1; Spearman-Rho Test		Änderung der CSMT zwischen V2 und V6 [µm] (n=55)	Änderung der CSMT zwischen V2 und V14 [µm] (n=47)	Änderung des FCP zwischen V2 und V6 (n=55)	Änderung des Foveal Center Point zwischen V2 und V14 n=47	Änderung CRT zwischen V2 und V14 (n=74)	Änderung CRT zwischen V2 und V14 (n=74)	Änderung der CSMT zwischen V2 und V6 [µm] (n=29)	Änderung der CSMT zwischen V2 und V14 [µm] (n=26)	Änderung des FCP zwischen V1 und V6 (n=29)	Änderung des FCP zwischen V2 und V14 (n=26)	Änderung CRT zwischen V2 und V14 (n=38)	Änderung CRT zwischen V2 und V14 (n=37)
	IL-8 [pg/ml]	KK	-0,038	0,113	-0,036	0,112	-0,006	0,034	<b>0,370*</b>	0,242	0,234	0,107	-,211
Signifikant (2-seitig)		0,781	0,450	0,797	0,452	0,961	0,773	0,048	0,234	0,221	0,603	0,203	0,572
IL-10 [pg/ml]	KK	0,095	0,157	0,103	0,113	-0,088	-0,061	0,278	0,311	0,327	0,338	-0,176	-0,110
	Signifikant (2-seitig)	0,492	0,291	0,453	0,451	0,458	0,604	0,145	0,122	0,084	0,091	0,289	0,516
IL-17A [pg/ml]	KK	<b>0,323*</b>	0,270	<b>0,280*</b>	0,232	-0,181	-0,191	<b>0,445*</b>	0,010	0,257	-0,150	-0,092	-0,171
	Signifikant (2-seitig)	0,016	0,066	0,038	0,116	0,124	0,103	0,016	0,962	0,179	0,465	0,581	0,312
MCP-1 [pg/ml]	KK	-0,179	0,134	-0,163	0,073	0,025	0,216	-0,145	0,104	0,358	0,090	0,147	0,298
	Signifikant (2-seitig)	0,192	0,369	0,234	0,627	0,833	0,065	0,452	0,615	0,057	0,662	0,377	0,073
VEGF [pg/ml]	KK	0,023	0,187	0,069	0,148	-0,070	-0,019	0,269	-0,218	-0,077	-0,297	0,080	-0,066
	Signifikant (2-seitig)	0,870	0,208	0,616	0,321	0,554	0,875	0,158	0,284	0,69	0,140	0,631	0,696
Apo-AI [µg/ml]	KK	0,031	-0,048	0,026	-0,128	-0,086	-0,068	-0,208	0,170	-0,251	0,063	-0,002	0,133
	Signifikant (2-seitig)	0,821	0,748	0,850	0,392	0,467	0,566	0,279	0,407	0,189	0,759	0,990	0,432



Apo-AII [µg/ml]	KK	0,195	-0,004	0,183	-0,100	-0,127	<b>-0,235*</b>	-0,188	0,213	-0,227	0,136	-0,114	0,120
	Signifikant (2-seitig)	0,154	0,978	0,181	0,505	0,281	0,044	0,330	0,297	0,236	0,507	0,494	0,481
Apo-B [µg/ml]	KK	0,191	0,141	0,128	-0,008	-0,145	-0,161	-0,056	0,187	-0,14	0,084	0,001	0,056
	Signifikant (2-seitig)	0,162	0,344	0,351	0,958	0,217	0,169	0,771	0,361	0,468	0,683	0,995	0,741
Apo-CII [µg/ml]	KK	0,194	0,062	0,176	-0,029	-0,160	-0,228	-0,191	0,119	-0,21	0,034	-0,090	0,092
	Signifikant (2-seitig)	0,155	0,677	0,200	0,847	0,172	0,050	0,322	0,562	0,275	0,870	0,590	0,587
Apo-CIII [µg/ml]	KK	0,187	0,012	0,210	-0,001	-0,159	-0,228	-0,105	0,042	-0,137	-0,063	-0,131	-0,048
	Signifikant (2-seitig)	0,171	0,937	0,123	0,994	0,176	0,051	0,587	0,840	0,478	0,760	0,434	0,779
Apo-E [µg/ml]	KK	0,232	0,077	0,194	-0,029	-0,200	<b>-0,238*</b>	-0,142	0,186	-0,182	0,110	-0,103	0,050
	Signifikant (2-seitig)	0,089	0,605	0,155	0,844	0,087	0,041	0,461	0,362	0,345	0,594	0,538	0,769
sVCAM-1 [ng/ml]	KK	-0,261	-0,041	<b>-0,297*</b>	-0,031	0,173	<b>0,322**</b>	-0,034	-0,266	0,029	-0,134	0,167	0,014
	Signifikant (2-seitig)	0,054	0,783	0,028	0,834	0,140	0,005	0,859	0,190	0,881	0,513	0,315	0,934
sICAM-1 [ng/ml]	KK	-0,221	-0,013	-0,247	-0,004	0,079	<b>0,255*</b>	-0,049	-0,290	0,042	-0,197	0,190	-0,029
	Signifikant (2-seitig)	0,104	0,932	0,070	0,978	0,501	0,028	0,802	0,151	0,829	0,334	0,254	0,864
IL-6 [pg/ml]	KK	<b>-0,268*</b>	-0,012	-0,243	-0,034	0,016	0,170	-0,186	-0,180	-0,173	-0,188	0,271	0,120
	Signifikant (2-seitig)	0,048	0,936	0,074	0,818	0,892	0,147	0,333	0,378	0,368	0,359	0,100	0,480

Tabelle 103 Korrelation der Biomarkerkonzentrationen an Visite 1 mit der Änderung anatomischer Parameter auf Behandlungsgruppen aufgeteilt. (Foveal Center Points zwischen Visite 1, 6 und 14 und Änderung der mittleren zentralen Subfield Dicke zwischen Visite 1, 6 und 14). \*Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig); \*\*Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig); CSMT: Central Subfield Mean Thickness; FCP: Foveal Center Point; KK: Korrelationskoeffizient

## 9 Literaturverzeichnis

1. Thews, G., E. Mutschler, and P. Vaupel, *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage ed. 1999, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
2. Lang, G.K., et al., *Augenheilkunde*. 4. Auflage ed. 2008, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
3. Deissler, H., et al., *VEGF-induced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by ranibizumab (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells*. *Br.J Ophthalmol.*, 2008. **92**(6): p. 839-843.
4. Antonetti, D.A., et al., *Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease*. *Diabetes*, 2006. **55**(9): p. 2401-2411.
5. Masland, R.H., *The fundamental plan of the retina*. *Nat.Neurosci.*, 2001. **4**(9): p. 877-886.
6. Cunha-Vaz, J., R. Bernardes, and C. Lobo, *Blood-retinal barrier*. *Eur.J.Ophthalmol.*, 2011. **21 Suppl 6**: p. S3-S9.
7. Bhagat, N., et al., *Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment*. *Surv.Ophthalmol.*, 2009. **54**(1): p. 1-32.
8. Browning, D.J., et al., *Diabetic macular edema: what is focal and what is diffuse?* *Am.J.Ophthalmol.*, 2008. **146**(5): p. 649-55, 655.
9. Bertram, B., *Blindheit und Sehbehinderung in Deutschland: Ursachen und Häufigkeit*. *Der Augenarzt*, 2005. **39**(6): p. 267-268.
10. Hammes, H.P., et al., *[Diabetic retinopathy and maculopathy]*. *Dtsch.Med Wochenschr.*, 2006. **131**(20): p. 1173-1175.
11. Lang, G.E., *[Diabetic retinopathy--staging and laser treatment]*. *Klin.Monbl.Augenheilkd.*, 2005. **222**(1): p. R1-13.
12. Williams, R., G.L. Van, and C. Lucioni, *Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes*. *Diabetologia*, 2002. **45**(7): p. S13-S17.
13. Huang, E.S., et al., *Rates of complications and mortality in older patients with diabetes mellitus: the diabetes and aging study*. *JAMA Intern.Med.*, 2014. **174**(2): p. 251-258.
14. Heintz, E., et al., *Prevalence and healthcare costs of diabetic retinopathy: a population-based register study in Sweden*. *Diabetologia*, 2010. **53**(10): p. 2147-2154.
15. Klein, R., et al., *Changes in visual impairment prevalence by period of diagnosis of diabetes: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy*. *Ophthalmology*, 2009. **116**(10): p. 1937-1942.
16. Petrella, R.J., et al., *Prevalence, Demographics, and Treatment Characteristics of Visual Impairment due to Diabetic Macular Edema in a Representative Canadian Cohort*. *J.Ophthalmol.*, 2012. **2012**: p. 159167.
17. Scanlon, P.H., et al., *The influence of background diabetic retinopathy in the second eye on rates of progression of diabetic retinopathy between 2005 and 2010*. *Acta Ophthalmol.*, 2013. **91**(5): p. e335-e339.
18. Hammes, H.P., Lemmen, K.D., Bertram, B., *Diabetische Retinopathie und Makulopathie (Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft)*. *Diabetologie*, 2010. **5**: p. 117-121.
19. Bundesärztekammer, K.B., und Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften. *Nationale Versorgungsleitlinie Diabetes: Prävention und Therapie von Netzhautkomplikationen*. 2010 2010 [cited 2011 9/23/2011]; Available from: [http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2\\_netzhaut/pdf/nvl\\_dm2netzha ut\\_lang.pdf](http://www.versorgungsleitlinien.de/themen/diabetes2/dm2_netzhaut/pdf/nvl_dm2netzha ut_lang.pdf).
20. Lang, G.E., *Pharmacological treatment of diabetic retinopathy*. *Ophthalmologica*, 2007. **221**(2): p. 112-117.
21. Group, D.C.a.C.T.R., *The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*. *N Engl J Med*, 1993(329): p. 977-986.

22. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. BMJ, 1998. 317(7160): p. 703-713.*
23. Keech, A.C., et al., *Effect of fenofibrate on the need for laser treatment for diabetic retinopathy (FIELD study): a randomised controlled trial. Lancet, 2007. 370(9600): p. 1687-1697.*
24. Gray, A., et al., *Implementing intensive control of blood glucose concentration and blood pressure in type 2 diabetes in England: cost analysis (UKPDS 63). BMJ, 2002. 325(7369): p. 860.*
25. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet, 1998. 352(9131): p. 837-853.*
26. *Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Ophthalmology, 1991. 98(5 Suppl): p. 766-785.*
27. *Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zur Therapie der diabetischen Makulopathie. 2010 2010 [cited 2011 9/23/2011]; Available from: <http://www.dog.org/wp-content/uploads/2009/09/Stellungnahme-zur-Therapie-der-diabetischen-Makulopathie-4.pdf>.*
28. Ziemssen, F., et al., [*In Process Citation*]. *Klin.Monbl.Augenheilkd.*, 2013. **230**(6): p. 614-628.
29. Ladas, I.D. and G.P. Theodosiadis, *Long-term effectiveness of modified grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. Acta Ophthalmol.(Copenh), 1993. 71(3): p. 393-397.*
30. Lee, C.M. and R.J. Olk, *Modified grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. Long-term visual results. Ophthalmology, 1991. 98(10): p. 1594-1602.*
31. Elman, M.J., et al., *Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results. Ophthalmology, 2012. 119(11): p. 2312-2318.*
32. *Photocoagulation for diabetic macular edema. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report number 1. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study research group. Arch.Ophthalmol., 1985. 103(12): p. 1796-1806.*
33. Mylonas, G., et al., *Retinal architecture recovery after grid photocoagulation in diabetic macular edema observed in vivo by spectral domain optical coherence tomography. Retina, 2013. 33(4): p. 717-725.*
34. Blumenkranz, M.S., et al., *Semiautomated patterned scanning laser for retinal photocoagulation. Retina, 2006. 26(3): p. 370-376.*
35. Yamada, Y., et al., *Imaging of laser-photocoagulated diabetic microaneurysm with spectral domain optical coherence tomography. Retina, 2013. 33(4): p. 726-731.*
36. Deissler, H.L. and G.E. Lang, [*Effect of VEGF165 and the VEGF aptamer pegaptanib (Macugen) on the protein composition of tight junctions in microvascular endothelial cells of the retina*]. *Klin.Monbl.Augenheilkd.*, 2008. **225**(10): p. 863-867.
37. Deissler, H.L., H. Deissler, and G.E. Lang, *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) is sufficient to completely restore barrier malfunction induced by growth factors in microvascular retinal endothelial cells. Br.J Ophthalmol., 2011. 95(8): p. 1151-1156.*
38. Deissler, H.L., H. Deissler, and G.E. Lang, *Inhibition of protein kinase C is not sufficient to prevent or reverse effects of VEGF165 on claudin-1 and permeability in microvascular retinal endothelial cells. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2010. 51(1): p. 535-542.*
39. Nakao, S., et al., *Intravitreal anti-VEGF therapy blocks inflammatory cell infiltration and re-entry into the circulation in retinal angiogenesis. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2012. 53(7): p. 4323-4328.*
40. Jousen, A.M., et al., *Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin-induced diabetes. FASEB J, 2003. 17(1): p. 76-78.*

41. Ip, M.S., et al., *Long-term effects of ranibizumab on diabetic retinopathy severity and progression*. Arch.Ophthalmol., 2012. **130**(9): p. 1145-1152.
42. Nguyen, Q.D., et al., *Primary End Point (Six Months) Results of the Ranibizumab for Edema of the mAcula in diabetes (READ-2) study*. Ophthalmology, 2009. **116**(11): p. 2175-2181.
43. Massin, P., et al., *Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE Study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study*. Diabetes Care, 2010. **33**(11): p. 2399-2405.
44. Mitchell, P., et al., *The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(4): p. 615-625.
45. Elman, M.J., et al., *Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2010. **117**(6): p. 1064-1077.
46. Nguyen, Q.D., et al., *Two-year outcomes of the ranibizumab for edema of the mAcula in diabetes (READ-2) study*. Ophthalmology, 2010. **117**(11): p. 2146-2151.
47. Elman, M.J., et al., *Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(4): p. 609-614.
48. Lang, G.E., et al., *Two-Year Safety and Efficacy of Ranibizumab 0.5 mg in Diabetic Macular Edema: Interim Analysis of the RESTORE Extension Study*. Ophthalmology, 2013.
49. Nguyen, Q.D., et al., *Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE*. Ophthalmology, 2012. **119**(4): p. 789-801.
50. Rajendram, R., et al., *A 2-year prospective randomized controlled trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy (BOLT) in the management of diabetic macular edema: 24-month data: report 3*. Arch.Ophthalmol., 2012. **130**(8): p. 972-979.
51. Do, D.V., et al., *The DA VINCI Study: phase 2 primary results of VEGF Trap-Eye in patients with diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(9): p. 1819-1826.
52. Michaelides, M., et al., *A prospective randomized trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy in the management of diabetic macular edema (BOLT study) 12-month data: report 2*. Ophthalmology, 2010. **117**(6): p. 1078-1086.
53. Diabetic Retinopathy Clinical Research, N., et al., *Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema*. N Engl J Med, 2015. **372**(13): p. 1193-203.
54. Do, D.V., et al., *One-year outcomes of the DA VINCI Study of VEGF Trap-Eye in eyes with diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2012. **119**(8): p. 1658-1665.
55. Korobelnik, J.F., et al., *Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema*. Ophthalmology, 2014.
56. Campochiaro, P.A., et al., *Sustained ocular delivery of fluocinolone acetonide by an intravitreal insert*. Ophthalmology, 2010. **117**(7): p. 1393-1399.
57. Campochiaro, P.A., et al., *Long-term benefit of sustained-delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts for diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2011. **118**(4): p. 626-635.
58. Campochiaro, P.A., et al., *Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts provide benefit for at least 3 years in patients with diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2012. **119**(10): p. 2125-2132.
59. Boyer, D.S., et al., *Three-year, randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with diabetic macular edema*. Ophthalmology, 2014. **121**(10): p. 1904-14.
60. Brownlee, M., *The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism*. Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1615-1625.
61. Chiu, C.J. and A. Taylor, *Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases*. Prog.Retin.Eye Res., 2011. **30**(1): p. 18-53.
62. Do, c.A., et al., *Breakdown of the inner and outer blood retinal barrier in streptozotocin-induced diabetes*. Exp.Eye Res., 1998. **67**(5): p. 569-575.

63. Gabbay, K.H., L.O. Merola, and R.A. Field, *Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes*. Science, 1966. **151**(707): p. 209-210.
64. Lee, A.Y. and S.S. Chung, *Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 23-30.
65. Kolm-Litty, V., et al., *High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells*. J.Clin.Invest, 1998. **101**(1): p. 160-169.
66. Sayeski, P.P. and J.E. Kudlow, *Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription*. J.Biol.Chem., 1996. **271**(25): p. 15237-15243.
67. Wells, L. and G.W. Hart, *O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar*. FEBS Lett., 2003. **546**(1): p. 154-158.
68. Chen, Y.Q., et al., *Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells*. J.Biol.Chem., 1998. **273**(14): p. 8225-8231.
69. Kuboki, K., et al., *Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 676-681.
70. Matsumoto, T., et al., *Involvement of NO and MEK/ERK pathway in enhancement of endothelin-1-induced mesenteric artery contraction in later-stage type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat*. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol, 2009. **296**(5): p. H1388-H1397.
71. Motojima, M., J. Kakuchi, and T. Yoshioka, *Association of TGF-beta signaling in angiotensin II-induced PAI-1 mRNA upregulation in mesangial cells: role of PKC*. Biochim.Biophys.Acta, 1999. **1449**(3): p. 217-226.
72. Xu, H., et al., *Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor*. Cardiovasc.Res., 2008. **78**(2): p. 349-355.
73. Geraldes, P., et al., *Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy*. Nat.Med., 2009. **15**(11): p. 1298-1306.
74. Gao, L. and G.E. Mann, *Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling*. Cardiovasc.Res., 2009. **82**(1): p. 9-20.
75. Giardino, I., D. Edelstein, and M. Brownlee, *Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes*. J Clin.Invest, 1994. **94**(1): p. 110-117.
76. Shinohara, M., et al., *Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis*. J Clin.Invest, 1998. **101**(5): p. 1142-1147.
77. McLellan, A.C., et al., *Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications*. Clin.Sci.(Lond), 1994. **87**(1): p. 21-29.
78. Charonis, A.S., et al., *Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation*. Diabetes, 1990. **39**(7): p. 807-814.
79. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-820.
80. Kirstein, M., et al., *Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins*. J Clin.Invest, 1992. **90**(2): p. 439-446.
81. Vlassara, H., et al., *Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling*. Science, 1988. **240**(4858): p. 1546-1548.
82. Abordo, E.A. and P.J. Thornalley, *Synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts*. Immunol.Lett., 1997. **58**(3): p. 139-147.

83. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept.* Cardiovasc.Res., 1998. **37**(3): p. 586-600.
84. Esposito, C., et al., *Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties.* J Exp.Med, 1989. **170**(4): p. 1387-1407.
85. Vlassara, H., R. Bucala, and L. Striker, *Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging.* Lab Invest, 1994. **70**(2): p. 138-151.
86. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2000. **97**(22): p. 12222-12226.
87. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.* Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-790.
88. Bristow, E.A., et al., *The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure.* Arch.Ophthalmol., 2002. **120**(6): p. 791-796.
89. Wangsa-Wirawan, N.D. and R.A. Linsenmeier, *Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects.* Arch.Ophthalmol., 2003. **121**(4): p. 547-557.
90. Bentmann, A., et al., *Divergent distribution in vascular and avascular mammalian retinae links neuroglobin to cellular respiration.* J.Biol.Chem., 2005. **280**(21): p. 20660-20665.
91. Pournaras, C.J., *Retinal oxygen distribution. Its role in the physiopathology of vasoproliferative microangiopathies.* Retina, 1995. **15**(4): p. 332-347.
92. Reiter, C.E., et al., *Characterization of insulin signaling in rat retina in vivo and ex vivo.* Am.J.Physiol Endocrinol.Metab, 2003. **285**(4): p. E763-E774.
93. Reiter, C.E., et al., *Diabetes reduces basal retinal insulin receptor signaling: reversal with systemic and local insulin.* Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1148-1156.
94. Kondo, T. and C.R. Kahn, *Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states.* J.Biol.Chem., 2004. **279**(36): p. 37997-38006.
95. Barber, A.J., et al., *The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes.* Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2005. **46**(6): p. 2210-2218.
96. Kondo, T., et al., *Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization.* J.Clin.Invest, 2003. **111**(12): p. 1835-1842.
97. Junger, M.A., et al., *The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling.* J.Biol., 2003. **2**(3): p. 20.
98. Mizutani, M., T.S. Kern, and M. Lorenzi, *Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy.* J.Clin.Invest, 1996. **97**(12): p. 2883-2890.
99. Bringmann, A., A. Reichenbach, and P. Wiedemann, *Pathomechanisms of cystoid macular edema.* Ophthalmic Res., 2004. **36**(5): p. 241-249.
100. Antcliff, R.J. and J. Marshall, *The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy.* Semin.Ophthalmol., 1999. **14**(4): p. 223-232.
101. Cunha-Vaz, J., J.R. Faria de Abreu, and A.J. Campos, *Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes.* Br.J Ophthalmol., 1975. **59**(11): p. 649-656.
102. Ehrlich, R., et al., *Diabetic macular oedema: physical, physiological and molecular factors contribute to this pathological process.* Acta Ophthalmol., 2010. **88**(3): p. 279-291.
103. Nishikiori, N., et al., *Glial cell-derived cytokines attenuate the breakdown of vascular integrity in diabetic retinopathy.* Diabetes, 2007. **56**(5): p. 1333-1340.
104. Miyamoto, K., et al., *Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1999. **96**(19): p. 10836-10841.
105. Morigi, M., et al., *Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion.* J Clin.Invest, 1998. **101**(9): p. 1905-1915.
106. Knudsen, S.T., et al., *Macular edema reflects generalized vascular hyperpermeability in type 2 diabetic patients with retinopathy.* Diabetes Care, 2002. **25**(12): p. 2328-2334.

107. Ciulla, T.A., A.G. Amador, and B. Zinman, *Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies*. Diabetes Care, 2003. **26**(9): p. 2653-2664.
108. Stewart, M.W., *The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology*. Mayo Clin.Proc., 2012. **87**(1): p. 77-88.
109. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-985.
110. Shibuya, M., et al., *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*. Oncogene, 1990. **5**(4): p. 519-524.
111. Terman, B.I., et al., *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1677-1683.
112. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat.Med., 2003. **9**(6): p. 669-676.
113. Koch, S., et al., *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. Biochem.J., 2011. **437**(2): p. 169-183.
114. Shinkai, A., et al., *Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor*. J.Biol.Chem., 1998. **273**(47): p. 31283-31288.
115. Famiglietti, E.V., et al., *Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina*. Brain Res., 2003. **969**(1-2): p. 195-204.
116. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem.Pharmacol., 2002. **64**(5-6): p. 993-998.
117. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J., 1999. **13**(1): p. 9-22.
118. Chung, A.S., J. Lee, and N. Ferrara, *Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis*. Nat.Rev.Cancer, 2010. **10**(7): p. 505-514.
119. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*. Angiogenesis., 2006. **9**(4): p. 225-230.
120. Jeltsch, M., et al., *Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis*. Cold Spring Harb.Perspect.Biol., 2013. **5**(9).
121. Deissler, H.L., et al., *VEGF but not PlGF disturbs the barrier of retinal endothelial cells*. Exp.Eye Res., 2013. **115**: p. 162-171.
122. Huang, H., J. Shen, and S.A. Vinore, *Blockade of VEGFR1 and 2 suppresses pathological angiogenesis and vascular leakage in the eye*. PLoS.One., 2011. **6**(6): p. e21411.
123. Ho, V.C., et al., *Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice*. Circulation, 2012. **126**(6): p. 741-752.
124. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr.Rev., 1997. **18**(1): p. 4-25.
125. Ku, D.D., et al., *Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries*. Am.J.Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H586-H592.
126. Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani, *Endothelial cell-to-cell junctions*. FASEB J., 1995. **9**(10): p. 910-918.
127. Antonetti, D.A., et al., *Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy*. Semin.Ophthalmol., 1999. **14**(4): p. 240-248.
128. Roberts, W.G. and G.E. Palade, *Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor*. J.Cell Sci., 1995. **108** ( Pt 6): p. 2369-2379.
129. Gerber, H.P., et al., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J.Biol.Chem., 1998. **273**(46): p. 30336-30343.
130. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. Science, 1992. **258**(5089): p. 1798-1801.

131. Mehrad, B., M.P. Keane, and R.M. Strieter, *Chemokines as mediators of angiogenesis*. *Thromb.Haemost.*, 2007. **97**(5): p. 755-762.
132. Galvez, B.G., et al., *Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis*. *J Biol.Chem.*, 2005. **280**(2): p. 1292-1298.
133. Wakabayashi, Y., et al., *Correlation of vascular endothelial growth factor with chemokines in the vitreous in diabetic retinopathy*. *Retina*, 2010. **30**(2): p. 339-344.
134. Herder, C., et al., *Chemokines as risk factors for type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg study, 1984-2002*. *Diabetologia*, 2006. **49**(5): p. 921-929.
135. Trivella, D.B., et al., *Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family*. *Cell Mol.Life Sci.*, 2010. **67**(17): p. 2909-2935.
136. Lee, J.H., et al., *Cytokine profile of peripheral blood in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic retinopathy*. *Ann.Clin.Lab Sci.*, 2008. **38**(4): p. 361-367.
137. Ozturk, B.T., et al., *Effect of serum cytokines and VEGF levels on diabetic retinopathy and macular thickness*. *Mol.Vis.*, 2009. **15**: p. 1906-1914.
138. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. *Immunity.*, 2004. **21**(4): p. 467-476.
139. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity.*, 2006. **24**(2): p. 179-189.
140. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 231-234.
141. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-238.
142. Rollins, B.J., et al., *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*. *Am.J Pathol.*, 1990. **136**(6): p. 1229-1233.
143. Colobran, R., et al., *The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity*. *Clin.Exp.Immunol.*, 2007. **148**(2): p. 208-217.
144. Funatsu, H., et al., *Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema*. *Ophthalmology*, 2009. **116**(1): p. 73-79.
145. Klein, R., et al., *The association of atherosclerosis, vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes : the atherosclerosis risk in communities study*. *Ophthalmology*, 2002. **109**(7): p. 1225-1234.
146. Chew, E.Y., et al., *Effects of medical therapies on retinopathy progression in type 2 diabetes*. *N.Engl.J.Med.*, 2010. **363**(3): p. 233-244.
147. Sasongko, M.B., et al., *Serum apolipoprotein AI and B are stronger biomarkers of diabetic retinopathy than traditional lipids*. *Diabetes Care*, 2011. **34**(2): p. 474-479.
148. Hu, A., et al., *Low serum apolipoprotein A1/B ratio is associated with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetes*. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.*, 2012. **250**(7): p. 957-962.
149. Tolonen, N., et al., *Associations and interactions between lipid profiles, retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes: the FinnDiane Study*. *J.Intern.Med.*, 2013.
150. Bhattacharjee, P.S., et al., *High-glucose-induced endothelial cell injury is inhibited by a Peptide derived from human apolipoprotein E*. *PLoS.One.*, 2012. **7**(12): p. e52152.
151. Santos, A., et al., *The epsilon4 allele of apolipoprotein E gene is a potential risk factor for the severity of macular edema in type 2 diabetic Mexican patients*. *Ophthalmic Genet.*, 2002. **23**(1): p. 13-19.
152. Osborn, L., et al., *Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes*. *Cell*, 1989. **59**(6): p. 1203-1211.
153. Rice, G.E., J.M. Munro, and M.P. Bevilacqua, *Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism*. *J Exp.Med*, 1990. **171**(4): p. 1369-1374.
154. Elices, M.J., et al., *VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site*. *Cell*, 1990. **60**(4): p. 577-584.



155. Schmidt, A.M., et al., *Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes.* J Clin.Invest, 1995. **96**(3): p. 1395-1403.
156. Nowak, M., et al., *Blood serum levels of vascular cell adhesion molecule (sVCAM-1), intercellular adhesion molecule (sICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in diabetic retinopathy.* Clin.Exp.Med, 2008. **8**(3): p. 159-164.
157. Koga, M., et al., *Relationship between circulating vascular cell adhesion molecule-1 and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus.* Diabet.Med, 1998. **15**(8): p. 661-667.
158. Fasching, P., et al., *Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus.* J Clin.Endocrinol.Metab, 1996. **81**(12): p. 4313-4317.
159. Meleth, A.D., et al., *Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy.* Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2005. **46**(11): p. 4295-4301.
160. Seckin, D., et al., *Glycaemic control, markers of endothelial cell activation and oxidative stress in children with type 1 diabetes mellitus.* Diabetes Res.Clin.Pract., 2006. **73**(2): p. 191-197.
161. Yan, S.F., et al., *Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6.* J Biol.Chem., 1995. **270**(19): p. 11463-11471.
162. Cohen, T., et al., *Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor.* J Biol.Chem., 1996. **271**(2): p. 736-741.
163. Shimizu, E., et al., *Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema.* Jpn.J Ophthalmol., 2002. **46**(1): p. 78-83.
164. Klein, R., et al., *Inter-observer variation in refraction and visual acuity measurement using a standardized protocol.* Ophthalmology, 1983. **90**(11): p. 1357-1359.
165. Ferris, F.L., III, et al., *New visual acuity charts for clinical research.* Am.J Ophthalmol., 1982. **94**(1): p. 91-96.
166. *Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy. ETDRS report number 12. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group.* Ophthalmology, 1991. **98**(5 Suppl): p. 823-833.
167. Coscas, G., *OCT in AMD - Optical Coherence Tomography in Age-Related Macular Degeneration.* 2. Auflage ed. 2010, Heidelber: Springer-Verlag GmbH.
168. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography.* Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-1181.
169. Chen, T.C., et al., *Spectral domain optical coherence tomography: ultra-high speed, ultra-high resolution ophthalmic imaging.* Arch.Ophthalmol., 2005. **123**(12): p. 1715-1720.
170. *Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS report number 11. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group.* Ophthalmology, 1991. **98**(5 Suppl): p. 807-822.
171. Rosenfeld, P.J., et al., *Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration.* N Engl J Med, 2006. **355**(14): p. 1419-31.
172. Brown, D.M., et al., *Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study.* Ophthalmology, 2009. **116**(1): p. 57-65 e5.
173. Thach, A.B., et al., *Time to clinically significant visual acuity gains after ranibizumab treatment for retinal vein occlusion: BRAVO and CRUISE trials.* Ophthalmology, 2014. **121**(5): p. 1059-66.
174. Brown, D.M., et al., *Long-term Outcomes of Ranibizumab Therapy for Diabetic Macular Edema: The 36-Month Results from Two Phase III Trials: RISE and RIDE.* Ophthalmology, 2013.
175. Schmidt-Erfurth, U., et al., *Three-Year Outcomes of Individualized Ranibizumab Treatment in Patients with Diabetic Macular Edema: The RESTORE Extension Study.* Ophthalmology, 2014.
176. Elman, M.J., et al., *Intravitreal Ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: 5-year randomized trial results.* Ophthalmology, 2015. **122**(2): p. 375-81.

177. Funatsu, H., et al., *Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients*. Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol., 2005. **243**(1): p. 3-8.
178. Mukesh, B.N., et al., *Development of cataract and associated risk factors: the Visual Impairment Project*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(1): p. 79-85.
179. McKittrick, I.B., et al., *Urinary Matrix Metalloproteinase Activities: Biomarkers for Plaque Angiogenesis and Nephropathy in Diabetes*. Am.J Physiol Renal Physiol, 2011.
180. Das, A., et al., *Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 1999. **40**(3): p. 809-813.
181. Pae, H.O., et al., *A molecular cascade showing nitric oxide-heme oxygenase-1-vascular endothelial growth factor-interleukin-8 sequence in human endothelial cells*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2229-2238.
182. Banerjee, S., et al., *Multiplex bead analysis of vitreous humor of patients with vitreoretinal disorders*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2007. **48**(5): p. 2203-2207.
183. Suzuki, Y., et al., *Expression profiles of cytokines and chemokines in vitreous fluid in diabetic retinopathy and central retinal vein occlusion*. Jpn.J.Ophthalmol., 2011. **55**(3): p. 256-263.
184. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev., 2003. **14**(2): p. 155-174.
185. Hueber, W., et al., *Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis*. Sci Transl Med, 2010. **2**(52): p. 52ra72.
186. Gaudreault, J., et al., *Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits*. Retina, 2007. **27**(9): p. 1260-1266.
187. Chakravarthy, U., et al., *Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial*. Ophthalmology, 2012. **119**(7): p. 1399-1411.
188. Avery, R.L., et al., *Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD*. Br J Ophthalmol, 2014.
189. Group, C.R., et al., *Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2011. **364**(20): p. 1897-908.
190. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials Research, G., et al., *Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results*. Ophthalmology, 2012. **119**(7): p. 1388-98.
191. Aiello, L.P., et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-1487.
192. Shinoda, K., et al., *Clinical factors related to the aqueous levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy*. Curr.Eye Res., 2000. **21**(2): p. 655-661.
193. D'Amore, P.A., *Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 1994. **35**(12): p. 3974-3979.
194. Lahdenranta, J., et al., *An anti-angiogenic state in mice and humans with retinal photoreceptor cell degeneration*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2001. **98**(18): p. 10368-10373.
195. Spranger, J., et al., *Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation*. Diabetologia, 2000. **43**(11): p. 1404-1407.
196. Lip, P.L., et al., *Plasma VEGF and soluble VEGF receptor FLT-1 in proliferative retinopathy: relationship to endothelial dysfunction and laser treatment*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2000. **41**(8): p. 2115-2119.
197. Jong, M.C., M.H. Hofker, and L.M. Havekes, *Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3*. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol., 1999. **19**(3): p. 472-484.

198. Marcoux, C., et al., *Lipoprotein distribution of apolipoprotein C-III and its relationship to the presence in plasma of triglyceride-rich remnant lipoproteins*. *Metabolism*, 2001. **50**(1): p. 112-119.
199. Marcovina, S. and C.J. Packard, *Measurement and meaning of apolipoprotein AI and apolipoprotein B plasma levels*. *J Intern.Med*, 2006. **259**(5): p. 437-446.
200. Klein, R.L., et al., *Apolipoprotein C-III protein concentrations and gene polymorphisms in type 1 diabetes: associations with lipoprotein subclasses*. *Metabolism*, 2004. **53**(10): p. 1296-1304.
201. Staels, B., et al., *Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates*. *J.Clin.Invest*, 1995. **95**(2): p. 705-712.
202. Schuett, C. and B. Broeker, *Grundwissen Immunologie*. 3 ed. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
203. Simmons, D., M.W. Makgoba, and B. Seed, *ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM*. *Nature*, 1988. **331**(6157): p. 624-627.
204. Pigott, R., et al., *Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 1992. **187**(2): p. 584-589.
205. Detmar, M., et al., *Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice*. *J.Invest Dermatol.*, 1998. **111**(1): p. 1-6.
206. Kim, I., et al., *Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells*. *J.Biol.Chem.*, 2001. **276**(10): p. 7614-7620.
207. Xiao, M., et al., *Effects of retinal laser photocoagulation on photoreceptor basic fibroblast growth factor and survival*. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 1998. **39**(3): p. 618-630.
208. Maioli, M., et al., *Raised serum apolipoprotein (a) in active diabetic retinopathy*. *Diabetologia*, 1993. **36**(1): p. 88-90.
209. Keidar, S., et al., *The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **236**(3): p. 622-5.
210. Vogt, L., et al., *Cellular cholesterol efflux to plasma from proteinuric patients is elevated and remains unaffected by antiproteinuric treatment*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(1): p. 101-6.
211. Ferrario, C.M., et al., *The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis*. *Am J Med Sci*, 2002. **323**(1): p. 17-24.
212. Carnicer, R., et al., *Nitric oxide-releasing agent, LA419, reduces atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. **379**(5): p. 489-500.
213. Cavieres, V., et al., *Vascular hypercontractility and endothelial dysfunction before development of atherosclerosis in moderate dyslipidemia: role for nitric oxide and interleukin-6*. *Am J Cardiovasc Dis*, 2014. **4**(3): p. 114-22.
214. Albrecht, E.W., et al., *Protective role of endothelial nitric oxide synthase*. *J Pathol*, 2003. **199**(1): p. 8-17.
215. Lee, P.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis*. *Transplantation*, 2000. **69**(6): p. 1186-92.
216. Duplain, H., et al., *Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 342-5.
217. Platten, M., et al., *Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(35): p. 14948-53.
218. Silva-Filho, J.L., et al., *Angiotensin II is a new component involved in splenic T lymphocyte responses during Plasmodium berghei ANKA infection*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e62999.

219. Amador, C.A., et al., *Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes*. *Hypertension*, 2014. **63**(4): p. 797-803.
220. Chung, N.A., D.G. Beevers, and G. Lip, *Effects of losartan versus hydrochlorothiazide on indices of endothelial damage/dysfunction, angiogenesis and tissue factor in essential hypertension*. *Blood Press*, 2004. **13**(3): p. 183-9.
221. Efsthadiadou, Z., et al., *Lipid profile in subclinical hypothyroidism: is L-thyroxine substitution beneficial?* *Eur J Endocrinol*, 2001. **145**(6): p. 705-10.
222. Liu, X.Q., et al., *Effect of thyroid hormone on plasma apolipoproteins and apoA- and apoB-containing lipoprotein particles*. *Eur J Clin Invest*, 1998. **28**(4): p. 266-70.
223. Asami, T., T. Ciomartan, and M. Uchiyama, *Changes in serum apolipoprotein concentrations after L-thyroxine therapy in infants with congenital hypothyroidism*. *Metabolism*, 1999. **48**(11): p. 1343-5.
224. Anagnostis, P., et al., *The effect of L-thyroxine substitution on lipid profile, glucose homeostasis, inflammation and coagulation in patients with subclinical hypothyroidism*. *Int J Clin Pract*, 2014. **68**(7): p. 857-63.
225. Langouche, L., et al., *Intensive insulin therapy protects the endothelium of critically ill patients*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2277-86.
226. Wallace, M., et al., *Relationship between the lipidome, inflammatory markers and insulin resistance*. *Mol Biosyst*, 2014. **10**(6): p. 1586-95.
227. Bruun, J.M., et al., *Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men*. *Eur J Endocrinol*, 2003. **148**(5): p. 535-42.
228. Ghanim, H., et al., *Suppressive effect of insulin infusion on chemokines and chemokine receptors*. *Diabetes Care*, 2010. **33**(5): p. 1103-8.
229. Ruotsalainen, E., et al., *Changes in cytokine levels during acute hyperinsulinemia in offspring of type 2 diabetic subjects*. *Atherosclerosis*, 2010. **210**(2): p. 536-41.
230. Van Sickle, B.J., et al., *Increased circulating IL-8 is associated with reduced IGF-1 and related to poor metabolic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus*. *Cytokine*, 2009. **48**(3): p. 290-4.
231. Loppnow, H., K. Werdan, and C. Werner, *The enhanced plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors (sTNF-R1; sTNF-R2) and interleukin-10 (IL-10) in patients suffering from chronic heart failure are reversed in patients treated with beta-adrenoceptor antagonist*. *Auton Autacoid Pharmacol*, 2002. **22**(2): p. 83-92.
232. Gullestad, L., et al., *Effect of metoprolol on cytokine levels in chronic heart failure--a substudy in the Metoprolol Controlled-Release Randomised Intervention Trial in Heart Failure (MERIT-HF)*. *Am Heart J*, 2001. **141**(3): p. 418-21.
233. Ohtsuka, T., et al., *Effect of beta-blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **37**(2): p. 412-7.
234. Saku, K., et al., *Effects of lisinopril and bisoprolol on lipoprotein metabolism in patients with mild-to-moderate essential hypertension*. *Clin Ther*, 1995. **17**(6): p. 1136-46.
235. Lithell, H., et al., *Effects of small doses of bisoprolol on blood pressure and lipoprotein concentrations in hypertensive patients*. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993. **44**(1): p. 19-22.
236. Swaak, A.J., et al., *Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases*. *Scand J Rheumatol*, 1988. **17**(6): p. 469-74.
237. Urano, W., et al., *The inflammatory process in the mechanism of decreased serum uric acid concentrations during acute gouty arthritis*. *J Rheumatol*, 2002. **29**(9): p. 1950-3.
238. Ruggiero, C., et al., *Uric acid and inflammatory markers*. *Eur Heart J*, 2006. **27**(10): p. 1174-81.
239. Muether, P.S., et al., *Vascular endothelial growth factor in patients with exudative age-related macular degeneration treated with ranibizumab*. *Ophthalmology*, 2012. **119**(10): p. 2082-2086.

240. Muether, P.S., K.M. Droege, and S. Fauser, *Vascular endothelial growth factor suppression times in patients with diabetic macular oedema treated with ranibizumab*. Br.J.Ophthalmol., 2014. **98**(2): p. 179-181.
241. Rosenkilde, M.M. and T.W. Schwartz, *The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease*. APMIS, 2004. **112**(7-8): p. 481-495.
242. Gemsa, D., R.K. J., and R. K., *Immunologie*. 4. Auflage ed. 1997, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
243. Colobran, R., et al., *The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility*. Clin.Exp.Immunol., 2007. **150**(1): p. 1-12.
244. Ishizu, T., et al., *Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optospinal multiple sclerosis*. Brain, 2005. **128**(Pt 5): p. 988-1002.
245. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat.Immunol., 2001. **2**(9): p. 816-822.
246. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. J Immunol., 1991. **146**(10): p. 3444-3451.
247. de Waal, M.R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp.Med, 1991. **174**(4): p. 915-924.
248. Jankovic, D., et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp.Med, 2007. **204**(2): p. 273-283.
249. O'Garra, A. and P. Vieira, *T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10*. Nat.Rev.Immunol., 2007. **7**(6): p. 425-428.
250. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol., 1991. **147**(11): p. 3815-3822.
251. Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan, *Macrophage deactivation by interleukin 10*. J Exp.Med, 1991. **174**(6): p. 1549-1555.
252. Gazzinelli, R.T., et al., *IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages*. J Immunol., 1992. **148**(6): p. 1792-1796.
253. Chatelain, R., et al., *IL-10 inhibits ICAM-1 expression on human Langerhans cells but not on keratinocytes, dermal endothelial cells or fibroblasts*. Arch.Dermatol.Res., 1998. **290**(9): p. 477-482.
254. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu.Rev.Immunol., 2001. **19**: p. 683-765.
255. van, E.E., et al., *Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1088-1092.
256. Pennline, K.J., E. Roque-Gaffney, and M. Monahan, *Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse*. Clin.Immunol.Immunopathol., 1994. **71**(2): p. 169-175.
257. Denes, B., I. Fodor, and W.H. Langridge, *Autoantigens plus interleukin-10 suppress diabetes autoimmunity*. Diabetes Technol.Ther., 2010. **12**(8): p. 649-661.
258. Daschner, A., et al., *Different serum cytokine levels in chronic vs. acute Anisakis simplex sensitization-associated urticaria*. Parasite Immunol., 2011. **33**(6): p. 357-362.
259. Honkanen, J., et al., *IL-17 immunity in human type 1 diabetes*. J.Immunol., 2010. **185**(3): p. 1959-1967.
260. Ohshima, K., et al., *Roles of interleukin 17 in angiotensin II type 1 receptor-mediated insulin resistance*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 493-499.
261. Jagannathan-Bogdan, M., et al., *Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes*. J.Immunol., 2011. **186**(2): p. 1162-1172.

262. Arababadi, M.K., et al., *Nephropathic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases?* Diabetes Res.Clin.Pract., 2010. **87**(1): p. 33-37.
263. Fujino, S., et al., *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease.* Gut, 2003. **52**(1): p. 65-70.
264. Teunissen, M.B., et al., *Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes.* J Invest Dermatol., 1998. **111**(4): p. 645-649.
265. Chi, W., et al., *Upregulated IL-23 and IL-17 in Behcet patients with active uveitis.* Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2008. **49**(7): p. 3058-3064.
266. Metawi, S.A., et al., *Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA.* Clin.Rheumatol., 2011. **30**(9): p. 1201-1207.
267. Li, Y., et al., *Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis.* J Neuroimmunol., 2011. **234**(1-2): p. 155-160.
268. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis.* Nat.Med, 2002. **8**(5): p. 500-508.
269. Laan, M., et al., *Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways.* J.Immunol., 1999. **162**(4): p. 2347-2352.
270. Salcedo, R., et al., *Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression.* Blood, 2000. **96**(1): p. 34-40.
271. Viedt, C., et al., *MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor-kappaB and activating protein-1.* J Am.Soc.Nephrol., 2002. **13**(6): p. 1534-1547.
272. Lu, M., et al., *VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo.* Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 1999. **40**(8): p. 1808-1812.
273. Saab, S., et al., *Prevalence and risk factors for diabetes mellitus in moderate term survivors of liver transplantation.* Am.J.Transplant., 2006. **6**(8): p. 1890-1895.
274. Adamis, A.P., et al., *Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells.* Biochem.Biophys.Res.Commun., 1993. **193**(2): p. 631-638.
275. Aiello, L.P., et al., *Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells.* Arch.Ophthalmol., 1995. **113**(12): p. 1538-1544.
276. Shweiki, D., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1995. **92**(3): p. 768-772.
277. Kim, N.H., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy.* Kidney Int., 2005. **67**(1): p. 167-177.
278. Wilson, C., et al., *Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E.* Science, 1991. **252**(5014): p. 1817-1822.
279. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology.* Science, 1988. **240**(4852): p. 622-630.
280. Olivieri, O., et al., *Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease.* J.Lipid Res., 2003. **44**(12): p. 2374-2381.
281. Hiukka, A., et al., *Alterations of lipids and apolipoprotein CIII in very low density lipoprotein subspecies in type 2 diabetes.* Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1207-1215.
282. Fazekas, F., et al., *Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis.* Neurology, 2001. **57**(5): p. 853-857.
283. Zouali, H., L. Faure-Delanef, and G. Lucotte, *Chromosome 19 locus apolipoprotein C-II association with multiple sclerosis.* Mult.Scler., 1999. **5**(2): p. 134-136.
284. Koutsis, G., et al., *An APOA1 promoter polymorphism is associated with cognitive performance in patients with multiple sclerosis.* Mult.Scler., 2009. **15**(2): p. 174-179.
285. Sladkova, V., et al., *Degenerative and inflammatory markers in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients with relapsing-remitting course of disease and after clinical isolated syndrome.* Neurol.Res., 2011. **33**(4): p. 415-420.

286. Khalfaoui, T., G. Lizard, and A. Ouertani-Meddeb, *Adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) and diabetic retinopathy in type 2 diabetes*. J.Mol.Histol., 2008. **39**(2): p. 243-249.
287. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. J Immunol., 1986. **137**(1): p. 245-254.
288. Ceriello, A., et al., *Hyperglycemia-induced circulating ICAM-1 increase in diabetes mellitus: the possible role of oxidative stress*. Horm.Metab Res., 1998. **30**(3): p. 146-149.
289. Lutty, G.A., J. Cao, and D.S. McLeod, *Relationship of polymorphonuclear leukocytes to capillary dropout in the human diabetic choroid*. The American journal of pathology, 1997. **151**(3): p. 707.
290. Schroder, S., W. Palinski, and G.W. Schmid-Schonbein, *Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy*. Am.J Pathol., 1991. **139**(1): p. 81-100.
291. Joussen, A.M., et al., *A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy*. FASEB J, 2004. **18**(12): p. 1450-1452.
292. Naugler, W.E. and M. Karin, *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer*. Trends Mol.Med, 2008. **14**(3): p. 109-119.
293. Kern, P.A., et al., *Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance*. Am.J Physiol Endocrinol.Metab, 2001. **280**(5): p. E745-E751.
294. Ma, Y., et al., *Intraocular expression of serum amyloid a and interleukin-6 in proliferative diabetic retinopathy*. Am.J Ophthalmol., 2011. **152**(4): p. 678-685.
295. Oh, I.K., et al., *Inflammatory and angiogenic factors in the aqueous humor and the relationship to diabetic retinopathy*. Curr.Eye Res., 2010. **35**(12): p. 1116-1127.
296. Lang, G.E. and S.J. Lang, *[Clinical treatment of diabetic macular edema]*. Klin.Monbl.Augenheilkd., 2011. **228**(1): p. R1-11.
297. Lemmen, K.D. and H. Helbig, *Update diabetische Retinopathie und Makulopathie*. Der Diabetologe, 2008. **4**(2): p. 102-109.