

# Inhibition einer proliferativen Retinopathie durch den Serin-Protease-Inhibitor Aprotinin

<sup>1</sup>Hammes H.-P., <sup>1</sup>Chavakis E., <sup>1</sup>Riecke B., <sup>1</sup>Lin J., <sup>2</sup>Preissner K.T.  
<sup>1</sup>III. Med. Klinik, JLU, Gießen, <sup>2</sup>MPI, Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim



## Einleitung

Erkrankungen der Retina wie die Frühgeborenen-Retinopathie und die diabetische Retinopathie führen zum progredienten Visusverlust durch Gefäßneubildung (1-3). Durch die Hypoxie wird die Expression und Sekretion parakriner Faktoren einschließlich des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) durch retinale Stromazellen (Müllerzellen, Astrozyten) bedingt (4-6). VEGF erhöht die endotheliale Permeabilität und führt zur Extravasation von Plasmaproteinen, u.a. Plasminogen und Fibrinogen (10). VEGF stimuliert auch die Endothelzellen zur Transformation zum angiogenen Phänotyp mit veränderter Genexpression z.B. der Hochregulation von Effektormechanismen wie perizellulärer Proteolyse (Hochregulation von u-PA und t-PA) (7-10). u-PA und t-PA aktivieren Plasminogen zu aktivem Plasmin. Bei der Angiogenese ist die Degradation der extrazellulären Matrix die Voraussetzung für Invasion und Migration von Endothelzellen und die Bildung neuer Kapillarlumina (Abbildung 1).

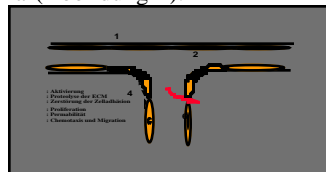


Abbildung 1: Stadien der Angiogenese

An der perizellulären Proteolyse nehmen verschiedene Enzymsysteme wie die Metalloproteinasen und die Serin-Proteasen (z.B. Plasmin) teil. Plasmin ist teils direkt, teils indirekt (durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen) an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt (10). Aprotinin (MW 6500) ist ein Serin-Protease-Inhibitor, der mit hoher Effektivität Plasmin, aber auch andere Enzymaktivitäten inhibiert (11). In *in-vitro* Experimenten kann Aprotinin die Angiogenese verhindern (12,13). Unser Ziel war es, zu untersuchen, ob die systemische Gabe von Aprotinin in einem Mausmodell retinale Neovaskularisation *in-vivo* hemmen kann.

## Methodik

Die Untersuchungen erfolgten im Mausmodell der O<sub>2</sub>-induzierten retinalen Neovaskularisation (13) (Abbildung 2).

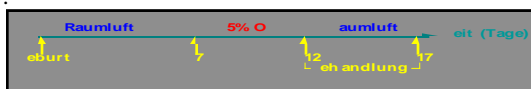


Abbildung 2: Experimentelles Protokoll der O<sub>2</sub>-induzierten Retinopathie der neugeborenen Maus

### A. Quantifizierung der retinalen Neovaskularisationen.

Die enukleierten Augen wurden in 4 % Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Axiale Schnitte (6 µm Dicke) wurden PAS-gefärbt. Zellkerne von Gefäßen auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran wurden in 15 Schnitten pro Retina (jeder 3. konsekutive Schnitt) gezählt. Die Zellquantifizierung erfolgte in Unkenntnis der Präparatidentität.

### B. Behandlung mit Aprotinin.

Direkt nach der Entnahme aus dem Inkubator (p12) wurde bei einer Teilgruppe eines Wurfes (insgesamt 2 Würfe) die subkutane Applikation von 2 x 200000 Kallikrein Inhibitor Einheiten Aprotinin /Kg x Tag über 5 Tage durchgeführt. Die Kontrolltiere erhielten eine Scheinbehandlung mit NaCl. Gruppenunterschiede wurden mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben geprüft

## Ergebnisse

In allen untersuchten Retinae wurde eine zentrale avaskuläre Zone als Ausdruck der Hyperoxie-induzierten Gefäßobliteration festgestellt. Die ersten retinalen Neovaskularisationen wurden fluoreszenzangiographisch 36-48 Stunden nach Rückführung der Tiere in Raumlufthaltung beobachtet (nicht gezeigt). Die subkutane Injektion von 2 x 200000 KIE Aprotinin/kg x Tag reduzierte die maximale Gefäßneubildung nach 5-tägiger Behandlung um 34 % im Vergleich zu den scheinbehandelten Kontrollen (Abbildung 3).

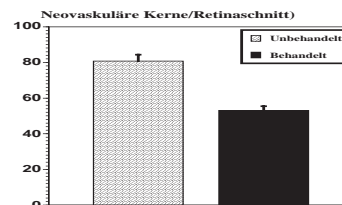


Abbildung 3: Effekt von Aprotinin auf die retinale Neovaskularisation im Mausmodell.

## Schlussfolgerungen

1. Dies ist der erste *in-vivo* Nachweis einer wirksamen Prävention einer proliferativen Retinopathie durch die systemische Verabreichung des Serin-Proteasen Inhibitors Aprotinin. Der inhibitorische Effekt (34 %) ist vergleichbar mit dem inhibitorischen Effekt (35 %) der gezielten Blockade von VEGF (15).
2. Der inhibitorische Effekt von Aprotinin auf die Angiogenese in diesem tierexperimentellen Modell ist ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Serin-Proteasen an der Entwicklung der proliferativen Retinopathie. Als wichtigstes Ziel der Aprotinin-bedingten Blockierung der Angiogenese kommt Plasmin in Frage. Es bleibt zu untersuchen, ob auch die Inhibition weiterer Serin-Proteasen wie z.B. Kallikrein relevant ist.

## Literatur

1. Prost M: Br J Ophthalmol 72, 363, 1988
2. Thylefors B, et al.: BullWorldHealthOrg 73, 115, 1995
3. Moss SE, et al.: Ophthalmology 101, 1061, 1994
4. Stone J, et al.: J Neurosci 15, 4738, 1995
5. Pierce EA, et al.: PNAS 92, 905, 1995
6. Schultz GS, Grant MB: Eye 5, 170, 1991
7. Bischoff J: Trends Cell Biol 5, 69, 1995
8. Bacharach E, et al.: PNAS USA 89, 10686, 1992
9. Strömblad S, Cheresch DA: Trends Cell Biol 6, 462, 1996
10. Senger DR: Am J Path 149, 1, 1996
11. Longstaff C: Blood Coagul Fibrinolysis 5, 537, 1994
12. Lu H, Mabilat C et al.: FEBS Letters 380, 21, 1996
13. Sato Y, et al.: Exp Cell Res 204, 223, 1993
14. Smith LEH, et al.: IOVS 35, 101, 1994
15. Aiello LP, et al.: PNAS 92, 10457, 1995