

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Claus Cursiefen

Der fibrozytenhemmende Effekt von Rapamycin auf Wundheilung nach
filtrierender Glaukomchirurgie

Inaugural–Dissertation zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde

der hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Dr. med. Benedikt Markus Schröter

aus Warstein

Promoviert am 23.10.2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. M. Diestelhorst
2. Berichterstatterin: Frau Universitätsprofessor Dr. med. S. A. Eming

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. med. Michael Diestelhorst und Dr. med. Manuel Hermann Köln, Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln , den 18.04.2013

Die Einbettung der untersuchten Augen und die Anfertigung der Paraffinschnitte, sowie deren Färbung wurden von mir mit Unterstützung der medizinisch-technischen Assistentin Frau Martina Becker durchgeführt.

Die im Rahmen des *invitro* Versuches untersuchte Zellkultur wurde ebenfalls von Frau Becker betreut und von Dr. med. Manuel Hermann und mir ausgewertet..

Die makroskopische und histologische Untersuchung, sowie die Auswertung der Ergebnisse ist von Dr. med. Manuel Hermann als zweitem Untersucher und mir durchgeführt worden.

Um einheitliche Operationsergebnisse zu erzielen wurden die Operationen an den Versuchstieren durch Prof. Dr. med. Michael Diestelhorst vorgenommen. Die Messung des intraokularen Druckes wurde von Dr. med. Manuel Herrmann und mir durchgeführt.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Diestelhorst für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung.

Herrn Dr. Manuel Hermann möchte ich für seine exzellente Betreuung und Unterstützung danken.

Frau Martina Becker möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die stets angenehmen Arbeitsbedingungen und Hilfestellungen bei allen Arbeiten.

Insbesondere möchte ich auch meinen Eltern danken: Meinem Vater Dr. Michael Schröter und meiner Mutter Gisela Schröter, die diesen Tag leider nicht mehr miterleben kann. Sie haben mich während meiner ganzen Ausbildung immer bedingungslos unterstützt und mir ein sehr schönes Studium in Würzburg, Innsbruck und Bonn sowie zahllose Auslandsaufenthalte ermöglicht.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich motiviert hat das Werk zu vollenden auch wenn sie während dieser Zeit häufig auf mich verzichten musste.

Für meine Eltern, meine Frau und meine Kinder

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	4
1.1 Glaukom	4
1.2 Glaukomtherapie	4
1.3 Verhinderung der Vernarbungsreaktion in der Glaukomchirurgie	5
1.4 Rapamycin / Sirolimus	5
1.4.1 Eigenschaften von Rapamycin	6
1.4.2 Effekte von Rapamycin auf die Wundheilung	7
1.4.3 Wirkmechanismus von Rapamycin	8
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 In vitro Versuch	12
2.1.1 Zellkultur	12
2.1.2 Untersuchung des Effekts verschiedener Dosierungen von Rapamycin auf die Proliferation von Tenonfibroblasten	12
2.2 In vivo Versuch	13
2.2.1 Augendruckmessung	14
2.3 Makroskopische Untersuchung	15
2.4 Histologie	15
2.4.1 Anilinfärbung	16
2.4.2 Hämatoxylin –Eosinfärbung	16
2.4.3 Van Gieson-Färbung	16
2.5 TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose	17
3 Ergebnisse.....	18
3.1 In vitro- Versuch	18
3.1.1 Tenon-Scratch Versuch	18

3.2	<i>In vivo- Versuch</i>	20
3.2.1	Intraokularer Druck in Kaninchen (IOD)	20
3.3	<i>Makroskopische Auswertung</i>	22
3.4	<i>Histologische Auswertung</i>	23
3.4.1	Skleradefekt	23
3.4.2	Skleralücke	25
3.4.3	Narbendicke	27
3.4.4	Episklerale Zelldichte	28
3.4.5	Sklerale Zelldichte	30
3.4.6	Beschaffenheit der episkleralen Narbe	32
3.4.7	Leukozytäre Infiltrate	33
3.4.8	Kammerwasseraustritt	35
3.4.9	Gefäße im Narbenareal	36
3.4.10	Ziliarkörpertoxizität	38
3.5	<i>TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose</i>	39
4	Diskussion	40
4.1	<i>Methodische Problematik</i>	40
4.1.1	<i>In vitro</i> Versuch	40
4.1.1.1	Zellkultur	40
4.1.2	<i>In vivo</i> Versuch	40
4.1.2.1	Druckmessung	41
4.1.3	Makroskopie	41
4.1.4	Histologie	41
4.1.5	TUNEL-Assay	42
4.2	<i>Eigenschaften von Rapamycin</i>	42
4.3	<i>Wertung der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur</i>	43
4.3.1	Antifibrotische Eigenschaften	43
4.3.2	Immunsuppressive Eigenschaften	44

4.3.3	Antiangiogenetische Eigenschaften	44
4.3.4	Einfluss von Rapamycin auf den intraokularen Druck	45
4.3.5	Einfluss von Applikationsort, Applikationsform und Applikationsdauer	45
4.3.6	Zytotoxizität und Apoptose	47
4.4	<i>Weitere mögliche Untersuchungen</i>	48
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	I
7	Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen	XII
8	Lebenslauf.....	XIII

1 Einleitung

1.1 Glaukom

Glaukom (grüner Star) ist ein Überbegriff für eine Gruppe pathophysiologisch heterogener Erkrankungen des Auges, bei denen es zu einer spezifischen chronischen Schädigung der retinalen Ganglienzellen mit ihren afferenten Nervenfasern der Sehbahn kommt. Im Jahr 2020 werden 79.7 Millionen Menschen weltweit am Glaukom erkranken und 5.9 Millionen eine beidseitige Blindheit erleiden. In Deutschland tritt das Glaukom bei 3% der Erwachsenen auf und führt zu 15% aller Erblindungen. Zumeist findet sich ein erhöhter Augeninnendruck, der zu einer irreversiblen Atrophie der Nervenfasern führt. Mit etwa 90% der Fälle ist das primäre Offenwinkelglaukom die häufigste Glaukomform. Ätiopathologisch liegt dieser Erkrankung eine verringerte Fazilität des Trabekelmaschenwerks zu Grunde, die zu einer Steigerung des intraokulären Druckes führt. Weitere Glaukomformen sind die dysgenetischen Glaukome, Glaukome mit engem Kammerwinkel und sekundäre Glaukome. Hierbei handelt es sich um eine Behinderung des Kammerwasserabflusses bei Traumata, intraokularen Entzündungen, Tumoren, Neovaskularisationen oder durch pathologische Ablagerungen im Kammerwinkel (Pigmentglaukom, Pseudoexfoliationsglaukom, Steroidglaukom).^{6,68,108-110}

1.2 Glaukomtherapie

Die Therapie der Offenwinkelglaukome besteht in der Senkung des intraokulären Druckes (IOD). Entsprechend den Guidelines der European Glaucoma Society steht in Deutschland primär die medikamentöse Drucksenkung im Vordergrund. Bei Versagen des konservativen Therapieregimes, d.h. Progression der Sehnervenschädigung und des Gesichtsfeldes unter Therapie, kann auf chirurgische Interventionen zur IOD-Senkung zurückgegriffen werden^{44,45}. Dieses trifft insbesondere auf die sekundären Glaukome und das Pseudoexfoliationsglaukom zu, die eine schlechte Prognose haben. Die am häufigsten angewandte Methode in der filtrierenden Glaukomchirurgie ist die Trabekulektomie^{19,67,140}. Hierbei wird ein transskleraler Abfluss des Kammerwassers von intraocular unter die Bindehaut durch die Präparation eines Skleraläppchens mit einer lokalisierten Exzision des Trabekelwerkes und einer basalen Iridektomie geschaffen. Subkonjunktival bildet sich eine

Filtrationszone, in der das Kammerwasser von dem umgebenden Bindehautgewebe resorbiert wird. Dieses führt zu einer wirkungsvollen Senkung des intraokularen Druckes. Allerdings ist die Rezidivgefahr – bedingt durch eine Vernarbungsreaktion im Bereich der Trabekulektomieöffnung – sehr hoch. Sie tritt in ca. 56% der Fälle auf und ist von der Erfahrung des Operateurs weitgehend unabhängig³⁰. Es kommt innerhalb der ersten postoperativen Wochen zu einer konjunktivalen und episkleralen Fibrosereaktion, verursacht durch die ortsständigen Fibroblasten aus den beteiligten Geweben.^{3,25,54,57,66,69,137,143,144}

1.3 Verhinderung der Vernarbungsreaktion in der Glaukomchirurgie

Die überschießende Vernarbungsreaktion führt zu einem fehlenden Langzeiterfolg. Diese unbefriedigenden Ergebnisse führten zu einer intensiven Suche nach einer medikamentösen Hemmung der Fibrosereaktion. Bereits in den Sechziger Jahren wurde die Inhibition der Fibroblastenaktivierung in der Glaukomchirurgie durch Kortikosteroide untersucht;^{139,141} In den Achtziger Jahren folgte die Untersuchung verschiedener Antimetaboliten. Heute werden überwiegend 5-Fluorouracil^{8,55,56,65,80,81,103,113,146,150} und Mitomycin C^{11,23,75,76,89,101,102,124,148} eingesetzt. Während 5-Fluorouracil eine wiederholte postoperative Applikation erfordert, wird Mitomycin einmalig intraoperativ angewendet. Mitomycin C hemmt die Vernarbungsreaktion durch die Inhibition der Zellteilung in den Fibroblasten. Da es aber nicht selektiv auf das Zielgewebe wirkt, kann es durch Diffusion zu Schädigungen an anderen Geweben des Auges kommen. So ließ sich die Zytotoxizität dieser Substanz in der Cornea, Retina, Sklera und dem Corpus Ciliare nachweisen, was den Einsatz von Mitomycin C in der Klinik limitiert^{24,125,135}. Aus diesem Grund hat die Suche nach einem neuen Wundheilungsmodulator in der Glaukomchirurgie einen hohen Stellenwert. Eine Substanz, die eine deutliche Hemmung der Vernarbungsreaktion am Auge bei geringerer Zytotoxizität verspricht, ist Rapamycin.

1.4 Rapamycin / Sirolimus

Rapamycin wurde in einer Bodenprobe auf der Osterinsel (Rapa Nui) durch die Canadian Medical Commission im Rahmen einer Suche nach neuen Antimykotika entdeckt^{96,147}. Hierbei handelt es sich um ein Makrolid-Antibiotikum, welches von dem Aktinomyzeten

Streptomyces hygroscopicus produziert wird. Es wird unter dem Handelsnamen Rapamune und der USAN-Bezeichnung Sirolimus geführt.

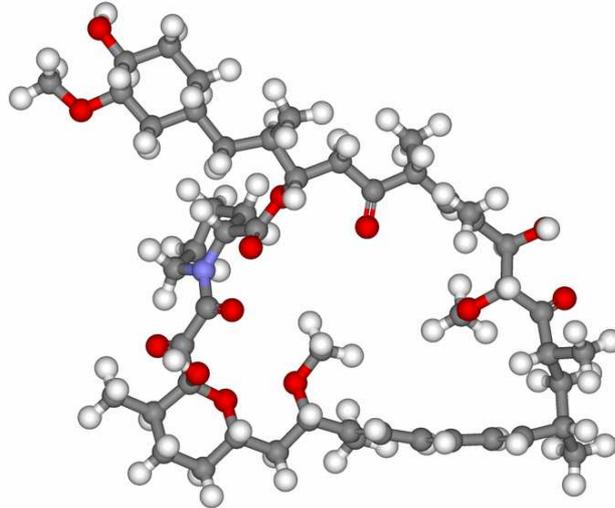


Abb. 1.4: Ball- and Stick-model of Sirolimus. Fvasconcellos, Wikipedia 01/2007.

1.4.1 Eigenschaften von Rapamycin

Rapamycin wurde als antimykotisches Mittel mit deutlicher Wirkung gegen *Candida* Spezies isoliert. In folgenden Studien zeigten sich beeindruckende immunsuppressive Eigenschaften, die den Einsatz als systemisches Antibiotikum oder Antimykotikum limitierten.¹²⁸ Die deutliche Hemmung der Aktivität von B- und T-Lymphozyten hat zu einem erfolgreichen Einsatz in der Transplantationsmedizin geführt.²¹ Bereits 1999 wurde Rapamycin in den USA als Medikament gegen die akute Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantationen zugelassen¹²⁰.

Die Zulassung in der Tumorthherapie wurde durch die Sorge um die Stabilität einer parenteralen Applikationsform trotz nachweisbarer Antitumoraktivität in verschiedenen Tumormodellen zunächst verlangsamt.¹² Seit 2007 ist das Rapamycinanalogon Temsirolimus zur Behandlung des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms von der FDA zugelassen. Hier konnte das Überleben der Patienten signifikant verlängert und die Anzahl an schwerwiegenden Komplikationen verringert werden.⁶¹ Eine Klasse II Studie zeigte eine deutliche Ansprechrate des Endometriumkarzinoms auf Temsirolimus.^{99,100} Derzeit werden die tumorsuppressiven Eigenschaften weiterer Rapamycinanaloga Deferolimus und

Everolimus in haematopoetischen, mesenchymalen und epithelialen Neoplasien untersucht^{2,38}.

In der Kardiologie wird Rapamycin auf Grund seiner antifibrotischen Eigenschaften eingesetzt. Seit 2002 ist der Rapamycin beschichtete Stent von der FDA zugelassen²⁰. In verschiedenen Studien (FIM¹³⁸, SIRIUS⁵⁸, SCANDSTENT^{73,74}, SIRTAX¹⁴⁹, REALITY⁹³) zeigte sich eine deutliche Verringerung der Restenoseraten der Stentimplantation. Allerdings zeigte sich in einigen Studien auch ein gesteigertes Risiko einer vaskulären Thrombose.

Denkbar erscheint der Einsatz von Rapamycin auch bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen. Im Moment wird der Effekt von Rapamycin in einer Phase II Studie bei Patienten mit Tuberöser Sklerose überprüft. Eine Beteiligung des Gehirns ist bei dieser Erkrankung häufig mit Epilepsie, mentaler Retardierung und Autismus vergesellschaftet. Im Mausmodell konnte eine deutliche Verbesserung verschiedener assoziierter kognitiver Defizite erreicht werden.^{26,34,88,97} Auch eine Therapie mit Rapamycin bei neurodegenerativen Erkrankungen mit Formation von intrazellularen Aggregaten wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington und verschiedener Formen der Demenz wird angestrebt. So können Rapamycinanaloge die Ansammlung von diesen Proteinaggregaten, die die neuronale Dysfunktion und den Zelltod in diesen Erkrankungen vermitteln, in präklinischen Modellen durch Autophagie verringern.^{10,111,112,116,118}

1.4.2 Effekte von Rapamycin auf die Wundheilung

Rapamycin inhibiert die Bildung von Extrazellulärmatrix bei Fibroblasten. Es zeigte sich, dass die antifibrotischen Eigenschaften von Rapamycin in humanen Lungenfibroblasten durch zwei additive Prozesse vermittelt werden. Zum einen führte eine Inkubation mit Rapamycin zu einer verringerten Expression von Typ I und III Kollagen, zum anderen zu einer verstärkten Expression der interstitiellen Kollagenase (MMP1). Beide Effekte konnten sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Auch die PDGF (platelet derived growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) vermittelte Proliferation von Fibroblasten wird durch Rapamycin gehemmt⁶⁴. *In vitro* Experimente mit Raw264.7 Makrophagen zeigten unter der Inkubation von Rapamycin eine verringerte Expression von iNOS (induzierbare NO-Synthase) und COX-2 (Cyclooxygenase 2) auf dem mRNA Level, welche zu einer deutlichen Verminderung der

NO (nitric oxide, Stickstoffmonoxid) und PGE2 (Prostaglandin E2) Produktion führte.⁷ Während NO die Wundheilung durch die Zunahme der Kollagenformation verstärkt¹²³, hat VEGF (vascular endothelial growth factor) proangiogenetische Eigenschaften, die zu einer beschleunigten Entwicklung des Granulationsgewebes führen⁹. Die Behinderung der Wundheilung durch Rapamycin konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden. So korreliert diese mit einer verringerten Expression von VEGF und NO in der kutanen Wunde der Ratte.¹²²

Die antiangiogenetischen Eigenschaften von Rapamycin sind mit einem Abfall der Produktion des VEGF verbunden. Sie ließen sich im Mausmodell in Lebermetastasen und bei der portalen Hypertension sowie in humanen Transplantatnieren nachweisen.^{40,51,119}

Auch im Auge konnten die antiangiogenetischen Eigenschaften von Rapamycin experimentell nachgewiesen werden. So zeigt sich in Allotransplantaten des Kaninchens eine deutliche Verringerung bei der Bildung von Neovaskularisationsgefäßen.¹³⁰ Die systemische Applikation von Rapamycin in Mäusen führte zu einer Verminderung der Produktion von VEGF und der choroidalen Neovaskularisation.²⁷

1.4.3 Wirkmechanismus von Rapamycin

Rapamycin hat einen einzigartigen molekularen Wirkmechanismus. Dieser liegt sowohl den antimykotischen, antiproliferativen als auch den immunsupprimierenden Effekten zu Grunde¹²⁹. Rapamycin hemmt die Aktivierung von TOR (Target of Rapamycin), einem zentralen Kontrollmolekül, welches für die Regulation des eukaryontischen Zellwachstums und der Zellproliferation von besonderer Bedeutung ist.¹³

Der proliferationshemmende Effekt von Rapamycin zeigt sich unter anderem in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC)^{22,43}. Diese Wirkung von Rapamycin wird auch bei der Proliferation von T- und B-Lymphozyten beobachtet. So kann die Aktivierung dieser Zellen durch die Inkubation mit Rapamycin gehemmt werden.⁷¹ Die zytokininduzierte Proliferation der Mastzellen⁵², sowie die FGF β (fibroblast growth factor β) stimulierte Proliferation von Fibroblasten⁵ kann durch Rapamycin ebenfalls inhibiert werden.

Dazu bindet Rapamycin zunächst an den intrazellulären Rezeptor FKBP12 (FK506 binding protein). Dieser Rapamycin/FKBP12-Komplex führt zu einer spezifischen Hemmung der Phosphatidylinositolkinase TOR.

Die besondere Bedeutung des Proteins TOR zeigt sich auch in dem hohen Grad der Konservierung seiner Aminosäuresequenz. Es finden sich Homologe von TOR in Hefen, Pflanzen und Fliegen.^{29,63} Die Aminosäuresequenz von mTOR (mammalian Target of Rapamycin) in Menschen, Mäusen und Ratten stimmt zu 95% überein.¹⁵ Ein Mausmodell mit einer nonsense-Mutation von mTOR ist nicht lebensfähig.⁵³ TOR funktioniert als ein Sensor für Mitogen-, Energie- und Nährstofflevel und dient als Schlüsselmolekül für die Zellzyklusprogression von der G1-Phase zur S-Phase.^{14,41}

Der mTOR Signalweg wird durch vier verschiedene Stimuli moduliert. Wachstumsfaktoren stimulieren mTOR durch die Aktivierung von Phosphoinositid-3 Kinasen und die Herstellung des bioaktiven Phosphatidylinositoltriphosphat. Die anderen drei bekannten TOR-Modulatoren sind mit einem zellulären, anabolen Metabolismus verbunden. Es handelt sich um Hypoxie, ein insuffizientes Aminosäureangebot und eine zu geringe intrazelluläre ATP Konzentration.¹

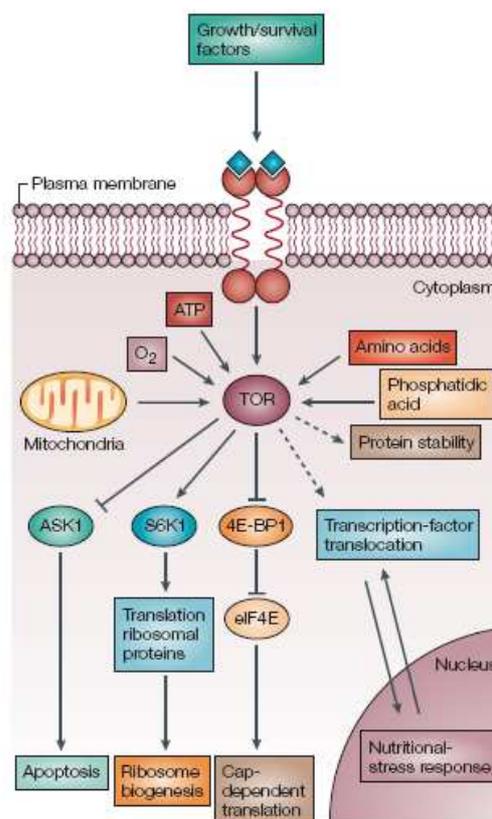


Abb. 1.4.3 *mTOR ist ein zentraler Regulator des Zellwachstums und der Proliferation. Bjornsti 2004*

Die Aktivierung von TOR führt zu einer Phosphorylierung von Kinasen. Dadurch wird die Translation sowohl über die Aktivierung der ribosomalen p70 S6-Kinase als auch über die Inaktivierung des Suppressorproteins 4E-BPs (4E binding protein-1) initiiert. Letzteres hat auch Auswirkungen auf die Zellzyklusprogression. So führt die Inaktivierung des 4E-BPs zu einer Hemmung des eIF4E (eucaryotic translation initiation factor 4E) Signalweges, der für die mRNA- Translation von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und Ornithindecaboxylase verantwortlich ist. Eine Hemmung dieser Translation durch Rapamycin führt so zu einem Stillstand der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Zusätzlich zu diesem Effekt verhindert Rapamycin eine Herunterregulation des cdk_i p27 (cyclin dependent kinase inhibitor p27) und führt somit zu einer Hochregulation von cdk-Proteinen (cyclin dependent kinase). Dadurch wird die Kinaseaktivität der cdk4/Cyclin D und cdk2/Cyclin E Komplexe verringert und über eine Aktivierung des Retinoblastom-Proteins (RB) der Übergang von der G1- in die S-Phase ebenfalls verhindert.^{17,39,83,115}

Dieser Effekt liegt auch der Inhibition der Migration von vaskulären glatten Muskelzellen durch Rapamycin zu Grunde. So deutet die Resistenz von p27-defizienten Zellen auf Rapamycin darauf hin, dass die Hemmung der Migration auch über p27 vermittelt wird.^{16,106,142}

Über den mTOR-Signalweg wird auch das Zellwachstum reguliert. Dabei spielt die oben bereits beschriebene Aktivierung der Translation eine wichtige Rolle. So waren Mutanten der *Drosophila melanogaster* mit funktionsloser S6-Kinase nur halb so groß wie der Wildtyp. Es zeigte sich ein vermindertes Zellwachstum bei gleicher Zellzahl.⁹² Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich bei der Maus. Auch hier waren die S6-Kinase Knock-out-Mäuse insbesondere während der Embryogenese deutlich kleiner.¹³⁶ Dieser Effekt wurde in humanen Zellen durch Rapamycin ebenfalls erzielt. So zeigten die Zellen unter der Inkubation mit Rapamycin eine verringerte Proliferationsrate und waren in allen Stadien des Zellzyklus kleiner als die Kontrollgruppe.³⁷ Ein weiterer Effekt von Rapamycin ist die Hemmung des Zellwachstums durch die Inhibition des Glukose- und Aminosäuretransports^{18,114}.

In den meisten Fällen resultiert aus der Inhibition von TOR Zytostase. In Tumorzellen mit mutierten p53 führt Rapamycin über die Aktivierung der ASK1 (apoptose-signal-regulating kinase 1) aber zur Apoptose.⁵⁹

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Effektes von Rapamycin auf die postoperative Vernarbung in der Glaukomchirurgie. Hierzu wurde zunächst *in vitro* eine wirksame Konzentration von Rapamycin ermittelt und dann im bereits zuvor etablierten Kaninchenmodell zur filtrierenden Glaukomchirurgie *in vivo* untersucht. In früheren Versuchen am Kaninchen zeigte sich, dass eine episklerale Wunde nach Glaukomchirurgie innerhalb von 4 Wochen zu einer narbigen Gewebeeränderung führt^{36,47}. Diese Veränderung zeichnete sich aus durch:

1. eine Umstrukturierung der Kollagenfasern der Sklera
2. eine Verdickung dieser Zone
3. eine fibröse Umwandlung im Bereich der Episklera und Bindehaut
4. eine infiltrierende Verzahnung zwischen Sklera und episkleralem Gewebe
5. einen erneuten Anstieg des Augeninnendruckes
6. eine makroskopische Vernarbung der Filtrationszone.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die makroskopischen und histomorphologischen Veränderungen der mit Rapamycin behandelten, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen, untersucht werden. Insbesondere soll die Umstrukturierung des Skleragerüsts und die Form der fibrösen Verzahnung zwischen Sklera und episkleralem Gewebe untersucht werden. Des Weiteren soll die bei Rapamycin beobachtete Inhibition von Neovaskularisationen in der Narbe untersucht werden. Durch Messung des Augendruckes über einen Zeitraum von 4 Wochen soll auch klinisch bestimmt werden, ob die Wirkung der Filtrationsoperation (Trabekulektomie) aufrechterhalten werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 *In vitro* Versuch

2.1.1 Zellkultur

Es wurden humane Tenonfibroblasten untersucht. Sie wurden im Rahmen von Glaukomoperationen bei nicht voroperierten Patienten routinemäßig gewonnen. Das hierbei entnommene Gewebe wurde zunächst in steriler Kochsalzlösung (0,9%) bei 4°C gelagert und innerhalb von 5 Stunden weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde in 1-2mm große Stücke geschnitten und in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) sowie Penicillin/Streptomycin (2 Volumenprozent) überführt. Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% O₂ kultiviert. Das Medium wurde 2 Mal pro Woche ausgetauscht.

Die aus diesem Gewebe auswachsenden Fibroblasten wurden nach etwa 3 Wochen mit Trypsin 0,05% und EDTA 0,02% (Gibco, BRL) abgelöst und erneut ausgesät. Für die Experimente wurden Zellen bei einer Konfluenz von 80 – 90% eingesetzt

2.1.2 Untersuchung des Effekts verschiedener Dosierungen von Rapamycin auf die Proliferation von Tenonfibroblasten

Zur Untersuchung der Proliferations- und Migrationsaktivität der Tenonfibroblasten diente der Scratch-Versuch. Hierbei wurde durch einen definiert dichten Zellrasen mittels eines feinen Zellschabers ein strichförmiger zellfreier Bereich geschaffen (Scratch). Unter normalen Kulturbedingungen wird dieser zellfreie Bereich innerhalb von weniger als 24 Stunden durch migrierende und proliferierende Fibroblasten von den Rändern her geschlossen. Unter Einwirkung von Wundmodulatoren wird der Schluss des Scratch deutlich verlangsamt bzw. verhindert.⁴⁹ Um dies zu bewerten, erfolgte im Versuch die Fotodokumentation nach 48 Stunden, sowie nach einer Woche und das Ausmessen der Breite des verbleibenden zellfreien Bereiches. Es wurden die Werte mit und ohne Rapamycin ermittelt und verglichen. Hierbei wurden Rapamycin-Konzentrationen von 50ng/ml bis 1000ng/ml untersucht. Eingesetzt wurde dazu Rapamune (Weyth

Pharmaceuticals. Inc Philadelphia PA 19101 USA). Der Zellrasen wurde bei 80 -90%iger Konfluenz für 20 Minuten mit DMSO allein und mit in DMSO gelösten Rapamune in Konzentrationen von 50, 100, 200, 500 und 1000 ng/ml inkubiert. Nach dem Mediumwechsel wurde der Scratch durchgeführt. Dieses artifizielle Narbenareal wurde dann nach 48 Stunden und nach einer Woche fotografiert und ausgewertet.

2.2 *In vivo* Versuch

Das pigmentierte Kaninchen (pigmented Chinchilla bastard) ist das Tier, das bei Versuchen am Auge international eingesetzt wird. Das Kaninchenauge ist dem menschlichen ähnlich, besitzt eine ausreichende Größe und zeichnet sich durch ausgeprägte Vernarbungsreaktionen aus. Das Pigment der Uvea absorbiert zahlreiche Pharmaka und schwächt somit deren Wirkung, ähnlich wie beim Menschen, ab. Insgesamt wurden 12 weibliche Versuchstiere (Alter 8-10 Wochen, Gewicht 1800 bis 2200 g) eingesetzt. Beidseits wurde eine filtrierende Glaukomchirurgie durchgeführt. Die rechten Augen erhielten eine Applikation von Rapamycin subkonjunktival in die Filtrationszone unmittelbar nach der Operation, um eine möglichst lange Verweildauer am OP-Situs zu gewährleisten. Die linken Augen dienten als intraindividuelle Kontrolle. Die verwendete Dosierung von Rapamycin war 20 µg pro Auge gelöst in 200µl PBS mit 1 % DMSO und somit deutlich unterhalb der Toxizitätsschwelle aus Vorversuchen.

Filtrierende Glaukomchirurgie: gedeckte Goniotrepanation mit und ohne Rapamycin

Bei der Operation der Kaninchenaugen wurde, analog zur Trabekulektomie am menschlichen Auge, die Bindehaut bei 1-2 Uhr in 5 mm Limbusabstand über eine Länge von ca. 5 mm limbus-parallel eröffnet. Es erfolgte die Präparation der blanken Sklera bis zum Limbus. Dann Trepanation in die vordere Augenkammer mittels eines 1,3 mm Handtrepans. Danach Bindehautnaht mit resorbierbarem Vicryl 8-0 Faden in Einzelknopfnähten. Es folgte bei den rechten Augen die Lokalapplikation von 20 µg Rapamycin subkonjunktival in die Filtrationszone.

Der Eingriff erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. 15 Minuten je Auge. Postoperativ erhielten alle Augen - analog zur postoperativen Betreuung beim Menschen - Inflanegent-Augentropfen (Prednisolon/Gentamycin Kombination) 3-5mal täglich zur Infektionsverhütung über zwei Wochen.

2.2.1 Augendruckmessung

Nach der Operation wurde der Augeninnendruck über einen Zeitraum von 4 Wochen gemessen. Zur Untersuchung der Effektivität der Drucksenkung erfolgte die Messung des Augeninnendruckes alle 3 Tage unter Lokalanästhesie (Lidocain-Augentropfen) mit dem Tonometer TonoVet des Herstellers Icare. Das Icare Tonometer basiert auf der nichtinvasiven Technik der Augeninnendruckmessung, die bei verschiedenen Versuchstieren verwendet wird und auch für das Kaninchenmodell etabliert ist.⁷⁰ Entscheidender Vorteil dieser Methode ist die leichte Trainierbarkeit der Versuchstiere auf diese Art der Augendruckmessung. Eine Anwendung von anästhesierenden Aufentropfen oder Sedativa ist somit nicht notwendig. Die Nachteile einer Fehlmessung auf Grund zu hoher Lidspannung und falscher Handhabung ist bei einem entsprechend trainierten Versuchstier und bei Durchführung der Messung durch einen erfahrenen Untersucher als gering einzuschätzen.



Abb. 2.2.1 TonoVet Tonometer des Herstellers ICare, Tiolat Oy, Helsinki Finnland

2.3 Makroskopische Untersuchung

Die Enukleation der Bulbi erfolgte in der 4. Woche post operationem. Auf Grund langjähriger Erfahrung ist zu diesem Zeitpunkt die Vernarbung beurteilbar.^{35,46} Die Morphologie der Narbe wurde mittels eines Bewertungskataloges charakterisiert und fotografiert. Der Bewertungskatalog umfasste die makroskopische Einteilung des Goniomieareals in lucides Areal mit einem deutlich sichtbaren Skleradefekt, eine weißliche Narbe mit noch sichtbarem Skleradefekt und in eine weiße Narbe, ohne sichtbaren Skleradefekt.

2.4 Histologie

Nach der Aufnahme der makroskopischen Bilder wurde durch Abpräparation der Polkappen ein Ring von etwa 10mm Breite ausgeschnitten, indem die temporale und nasale Kalotte mit einer Rasierklinge abgetrennt wurden. Die sklerokornealen Ringe enthielten das OP-Areal einschließlich Bindehaut. Der Abstand des Operationsgebietes zum Rand des Ringes wurde ausgemessen. Anschliessend folgte die Einbettung in Paraffin. Nach Anschnitt des Auges im Paraffin mit dem Mikrotom wurde die zuvor gemessene Position der Narbe angezeichnet, um das Anschneiden des OP-Areals zu erleichtern. In der erwarteten Lokalisation wurden Stufen von 100µm angelegt, um die maximale Ausdehnung des Goniomieareals sicher aufzufinden. Es wurden 5µm dünne Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden dann bei 37°C in einem Wärmeschrank mindestens 24 Stunden getrocknet.

Dann erfolgte die Deparaffinierung der Schnitte in Xylol für 2 x 10 Minuten. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 96%, 70%, 70%, 50%, Aqua dest.; jeweils 5 min.) rehydriert. Anschließend erfolgten die unten beschriebenen Färbungen. Die Schnitte wurden dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und für 2 x 10 Minuten in Xylol überführt. Danach erfolgte die Versiegelung der Präparate mit dem Eindeckmedium Cytoseal XYL (Microm) und Deckgläsern.

2.4.1 Anilinfärbung

Die Anilinfärbung ist zur Darstellung des Bindegewebes geeignet. Sie diente zum Auffinden und der Orientierung innerhalb der Narbe. So wurde an Hand der Anilinfärbten Schnitte die Stufe mit der maximalen Ausdehnung des Goniotomieareals gemessen und diese für die weiteren Färbungen ausgewählt.

Die Präparate wurden 3 Minuten in Anilinblau gefärbt und anschliessend mehrfach mit Aqua dest. gespült.

2.4.2 Hämatoxylin –Eosinfärbung

Die Hämatoxylin –Eosinfärbung dient der Darstellung von Zellkernen, Zytoplasma und Bindegewebe. Sie wurde zur Ermittlung der Zelldichte in der Skleranarbe und in der episkleralen Narbe genutzt. Auch das Ziliarkörperepithel, das Ausmaß der Neovaskularisation und die Anzahl und Art der Immunzellen konnten so untersucht werden.

Zunächst erfolgte die Kernfärbung in Mayer`s Hämalan für 10 Minuten. Nach der Spülung mit Aqua dest. wurden die Zellkerne in warmem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Es folgte die Zytoplasmafärbung in Eosin G 1% für 3 Minuten und eine erneute Spülung mit Aqua dest.

2.4.3 Van Gieson-Färbung

Die Van Gieson-Färbung wurde als Differentialfärbung zur Darstellung von Kollagen und Bindegewebe eingesetzt. In dieser Färbung konnte die Dichte der Extrazellulärmatrix bzw. die Durchlässigkeit der Narbe sehr gut dargestellt werden. Das dichte, kollagenreiche Narbengewebe wurde rot, das lockere durchlässige Narbengewebe gelb angefärbt. In dieser Färbung war die Messung der verbliebenen Skleralücke und des Kammerwasseraustrittes möglich.

Erst wurden Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung A und B zu gleichen Teilen gemischt. Die Präparate wurden 10 Minuten in der Lösung belassen. Nach der Spülung mit Aqua dest. wurden die Zellkerne in nicht destiliertem Wasser bei Raumtemperatur für 10 Minuten

gebläut. Im Anschluss erfolgte die Färbung in Pikrinsäure für 3 Minuten und eine erneute Spülung mit Aqua dest.

Die Präparate wurden mit einem Mikroskop Leica DM 2500 betrachtet. Die Bilder wurden mittels der digitalen Kamera JVC KY-F75U fotografiert, auf den Computer übertragen und mit dem Program Diskus Version 4.60.1766 des Ingenieurbüros Hilgers, Königswinter, ausgewertet.

2.5 TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose

Zum Nachweis von Apoptosen wurden die Gewebeschnitte mit dem In Situ Cell Death Detection Kit (TUNEL-Kit) der Firma Roche behandelt und die Apoptosen mit Fluorescein sichtbar gemacht. Das Kennzeichen der Apoptose ist die DNA-Degradation. Während der Apoptose wird genomische DNA gespalten. Es bilden sich sowohl Doppelstrang-DNA-Fragmente mit geringem Molekulargewicht (Mono- und Oligonukleotide), als auch DNA mit hohem Molekulargewicht nach Einzelstrang-Brüchen („nicks“). Anhand ihrer freien 3'-OH-Termini können diese Brüche im DNA-Strang durch modifizierte Nukleotide in einer Enzymreaktion identifiziert werden. Die Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert die Polymerisation von Fluorescein-markierten Desoxyribonukleotiden an das 3'-OH Ende. Daher wird die Methode TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) genannt.⁴²

3 Ergebnisse

3.1 *In vitro*- Versuch

3.1.1 Tenon-Scratch Versuch

Vor dem Tierversuch wurde der Effekt von Rapamycin auf Tenonfibroblasten *in vitro* untersucht. Dazu wurde mit einem feinen Zellschaber ein strichförmiger zellfreier Bereich (Scratch) in einem Zellrasen von Tenonfibroblasten bei 80 -90% -iger Konfluenz geschaffen. Unter normalen Bedingungen wird diese artifizielle Wunde innerhalb von 48 Stunden von den Rändern her durch einwandernde Fibroblasten geschlossen. In den folgenden Abbildungen wurde die Wirkung von Rapamycin in verschiedenen Dosierungen von 50 bis 1000ng/ml untersucht. Die Abbildungen 3.1.1.1 wurden nach 48 Stunden aufgenommen, die Abbildungen 3.1.1.2 nach 1 Woche.

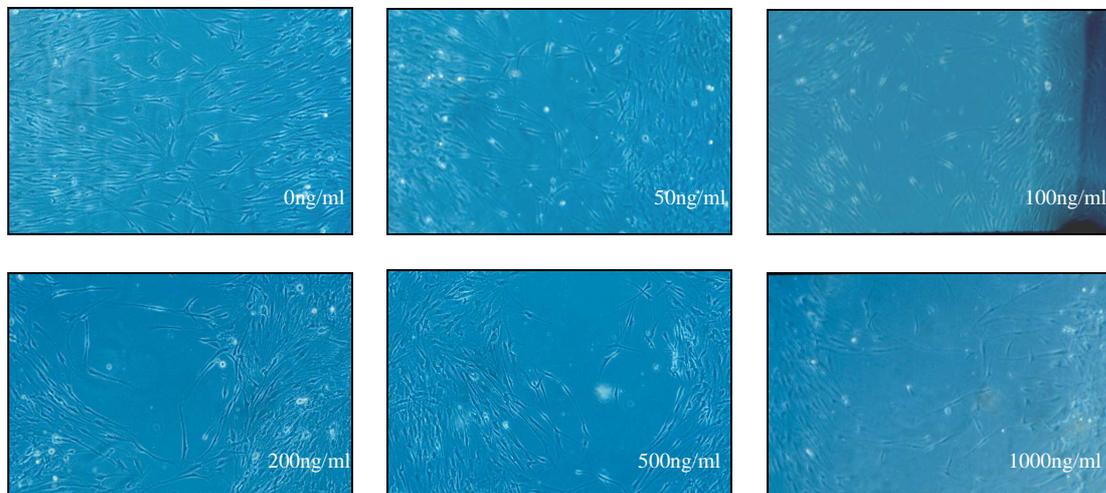


Abb. 3.1.1.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Proliferation von Tenonfibroblasten im Tenon-Scratch- Versuch nach 48 Stunden. Das Bild oben links zeigt die Kontrolle mit DMSO, die weiteren Bilder zeigen eine Inkubation mit Rapamycin gelöst in DMSO in Dosierungen von 50-1000 ng/ml.

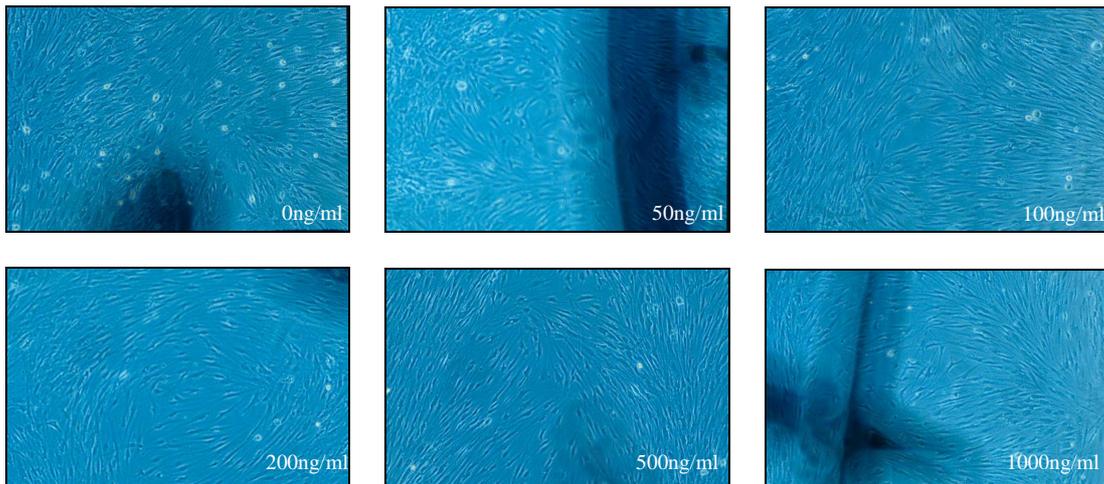


Abb. 3.1.1.2: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Proliferation von Tenonfibroblasten im Tenon-Scratch- Versuch nach einer Woche. Das Bild oben links zeigt die Kontrolle mit DMSO, die weiteren Bilder zeigen eine Inkubation mit Rapamycin gelöst in DMSO in Dosierungen von 50-1000 ng/ml.

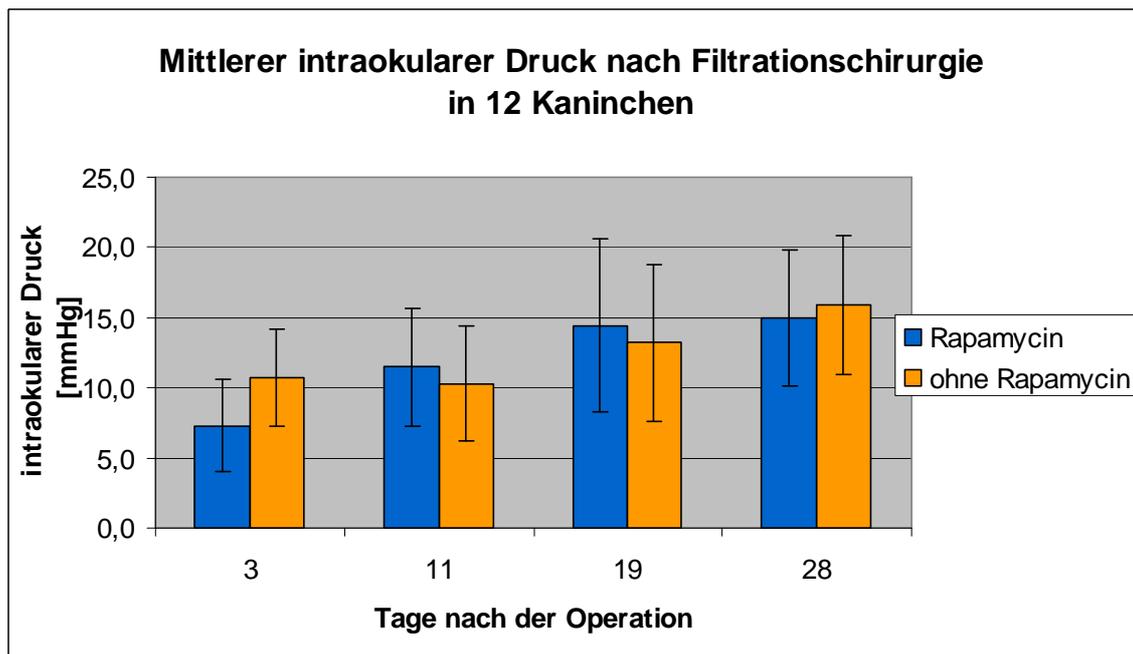
In den Abbildungen 3.1.1.1 zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt auf die Proliferation von Tenonfibroblasten unter der Inkubation mit Rapamycin nach 48 Stunden. Während in der Kontrolle das ganze zellfreie Areal wieder mit Tenonfibroblasten besiedelt worden ist, nimmt die Zelldichte in der Versuchsgruppe entsprechend den eingesetzten Konzentrationen von Rapamycin ab. Unter der Inkubation mit Rapamycin in einer Konzentration von 50ng/ml ist dieser Effekt noch vergleichsweise schwach, in einer Konzentration von 100-500ng/ml deutlich sichtbar. In der Dosierung von 1000ng/ml zeigen sich zytotoxische Wirkungen auf die Tenonfibroblasten.

In den Abbildungen 3.1.1.2 wird die Zellkultur nach einer Woche abgebildet. Hier lassen sich keine deutlichen Unterschiede der mit Rapamycin behandelten Tenonfibroblasten im Vergleich zur Kontrolle ausmachen. In allen eingesetzten Konzentrationen und in der Kontrolle war der zellfreie Scratch wieder mit Tenonfibroblasten besiedelt.

3.2 In vivo- Versuch

3.2.1 Intraokularer Druck in Kaninchen (IOD)

Die Messungen des IOD sind in Abb. 3.2.1.1. zusammengefasst. Der Gruppenvergleich zeigte einen signifikanten IOD Unterschied am dritten postoperativen Tag mit einem niedrigeren mittleren IOD in der Rapamycin Gruppe (t-Test für verbundene Stichproben).



T-Test	3.Tag	11. Tag	19. Tag	28. Tag
verb.Stichprobe	p= 0,0091	p= 0,3044	p= 0,4745	p= 0,3321

Abb. 3.2.1.1: Messung des intraokularen Druckes an den Tagen 3,11,19 und 28 nach der Trabekulektomie. Die rechten Augen (blau dargestellt) bekamen eine subkonjunkivale Injektion von 20µg Rapamycin

Eine erfolgreiche IOD Senkung im Verlauf (chirurgischer Erfolg) wurde als Senkung des IOD um 4mmHg oder mehr, ausgehend von einem Mittelwert vor OP von 18,7 mmHg, der sich aus IOD Messungen (n=72) an den unbehandelten Kaninchen (n=24) ergab. Das einmalige Unterschreiten des IOD-Senkungsziels wurde als Therapieversagen gewertet. Mittels Kaplan-Meier Analyse wurde die rechnerische „Überlebenszeit“ der erfolgreichen IOD Senkung nach Glaukomchirurgie für die beiden Gruppen verglichen. Abb. 3.2.1.2 zeigt die graphische Darstellung der Überlebensfunktionen. Es ergaben sich mediane und

mittlere geschätzte Überlebenszeiten wie in Tabelle 3.2.1.3 dargestellt. Die Unterschiede zwischen Rapamycin und DMSO Kontrolle waren nicht statistisch signifikant ($p = 0,72$, Log-Rank Test).

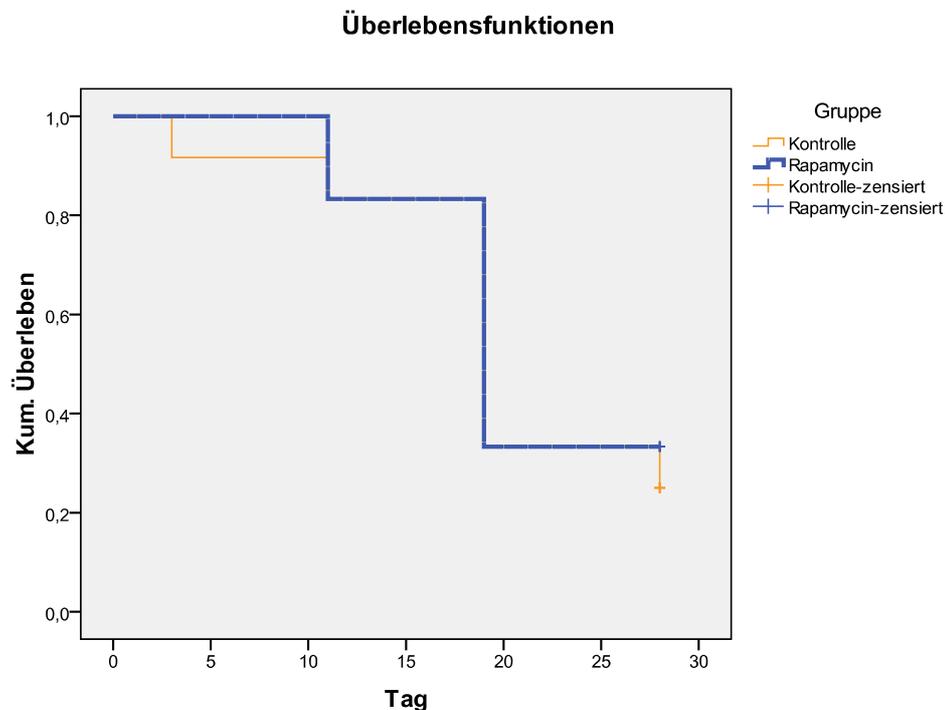


Abb. 3.2.1.2: Überlebenskurve der Filtrationsoperation

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

Gruppe	Mittelwerte				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
Kontrolle	20,000	2,222	15,645	24,355	19,000	2,177	14,732	23,268
Rapamycin	20,667	1,705	17,325	24,009	19,000	2,177	14,732	23,268
Gesamt	20,333	1,394	17,601	23,065	19,000	1,540	15,982	22,018

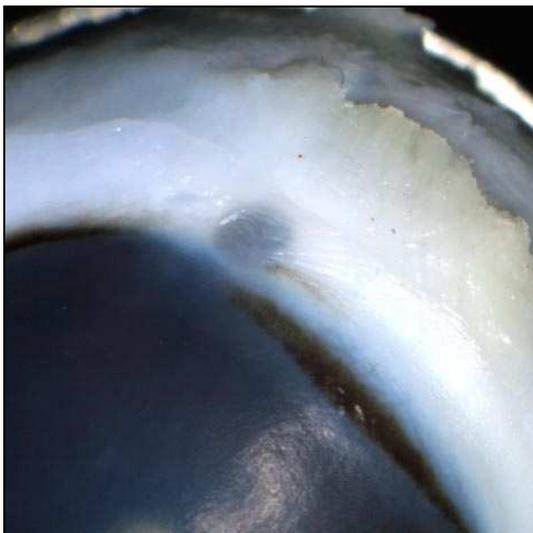
a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abb. 3.2.1.3: Kaplan-Meier Schätzung der Überlebenszeit erfolgreicher Filtrationschirurgie.

3.3 Makroskopische Auswertung

Der Effekt von Rapamycin auf die Vernarbung des Goniotomieareals wurde zunächst makroskopisch untersucht. Abbildung 3.3.1 zeigt das makroskopische Bild der Narbe nach filtrierender Glaukomchirurgie an den Augen eines Versuchstieres nach erfolgter Enukleation. Das mit Rapamycin behandelte Auge ist links abgebildet, während das andere Auge als intraindividuelle Kontrolle rechts abgebildet ist. Exemplarisch wird hierbei das Versuchstier 5 herangezogen. In Tabelle 3.3.2 sind die Ergebnisse der makroskopischen Beurteilungen dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Summe der negativen gleich der Summe der positiven Ränge) zwischen den mit Rapamycin behandelten Augen im Vergleich zu der Kontrolle.

Tier 5



Rapamycin

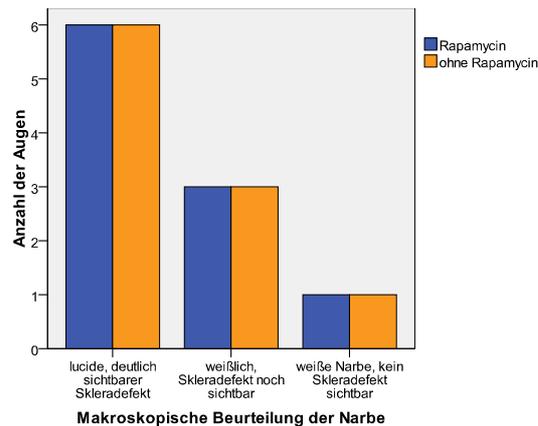


ohne Rapamycin

Abb. 3.3.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die makroskopisch sichtbare Vernarbung des Goniotomieareals.

Linke Abbildung: + 20µg Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.

Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO



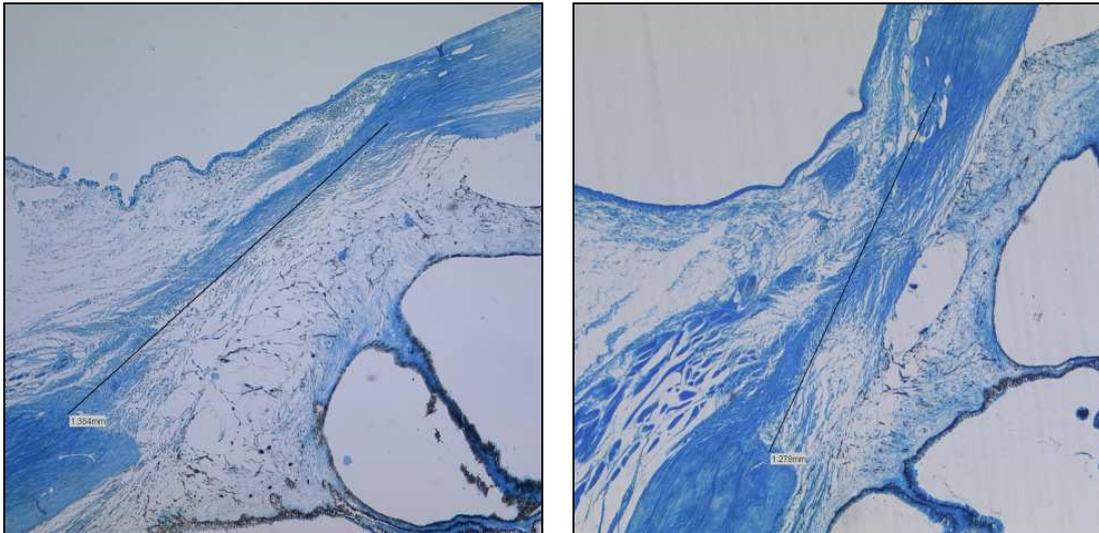
Tab.3.3.2: Makroskopische Beurteilung des Effekts von Rapamycin auf die Vernarbung des Goniotoomieareals. (n=22)

3.4 Histologische Auswertung

Der Effekt von Rapamycin auf die Vernarbung des Goniotoomieareals wurde histologisch untersucht. Hierbei wurden verschiedene Parameter beobachtet. Wie auch bei der makroskopischen Untersuchung wird in den folgenden Abbildungen das Versuchstier 5 als Beispiel herangezogen. Da bei einem Auge die Narbe in ihrer maximalen Ausdehnung nicht im histologischen Schnitt aufgefunden wurde, konnten somit die Daten des korrespondierenden Auges ebenfalls nicht verwendet werden. Es wurde insgesamt ein Kollektiv von 10 Tieren histologisch untersucht.

3.4.1 Skleradefekt

Der Skleradefekt wurde in den mit Anilin angefärbten Präparaten untersucht, wie in Abbildung 3.4.1.1 exemplarisch abgebildet. Hierbei wurde die maximale Ausdehnung des Goniotoomieareals der mit Rapamycin behandelten Augen mit der denen der Kontrolle in 50facher Vergrößerung verglichen.

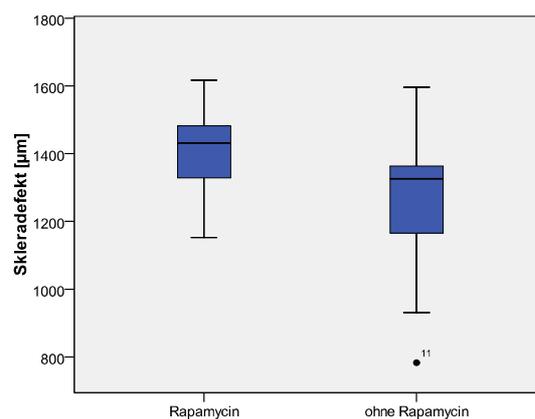


Rapamycin

ohne Rapamycin

Abb. 3.4.1.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die maximale Ausdehnung des Skleradefektes.
 Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
 Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO

Die von zwei Untersuchern unabhängig voneinander gemessenen Ergebnisse zeigt die Tabelle 3.4.1.2. Der T-Test bei gepaarten Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied. ($T = 1,777$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,106).



Tab.3.4.1.2: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die maximale Ausdehnung des Skleradefektes.
 Linkes Balkendiagramm: + 20µg Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
 Rechtes Balkendiagramm: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO
 $T = 1,777$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,106

3.4.2 Skleralücke

Während die Untersuchung des Skleradefektes in der Anilinfärbung die maximale Ausdehnung des noch erkennbaren Goniotomieareals zeigte, erlaubte die Untersuchung der Skleralücke in der van Gieson Färbung eine qualitative Unterscheidung des neu gebildeten Narbengewebes. Die Abgrenzung des gelb gefärbten, lockeren Bindegewebes von dem rot angefärbten, dichten, kollagenreichen Bindegewebe machte eine Untersuchung der nach der Operation noch verbliebenen Skleralücke möglich. Wie in Abbildung 3.4.2.1 gezeigt, konnte die maximale Ausdehnung des noch durchlässigen Bindegewebes als Skleralücke gemessen werden.

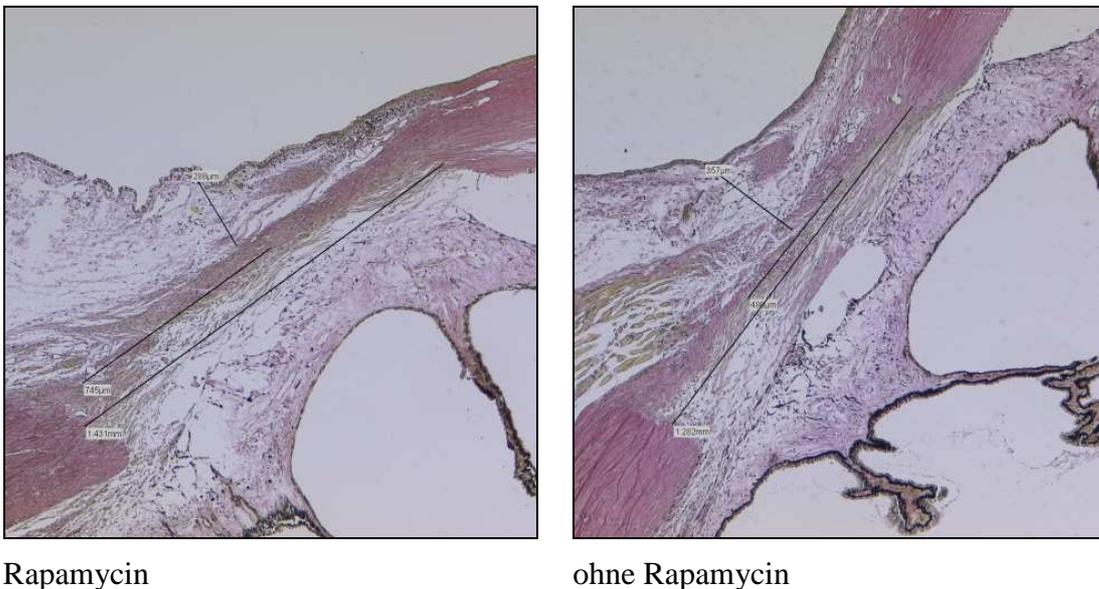
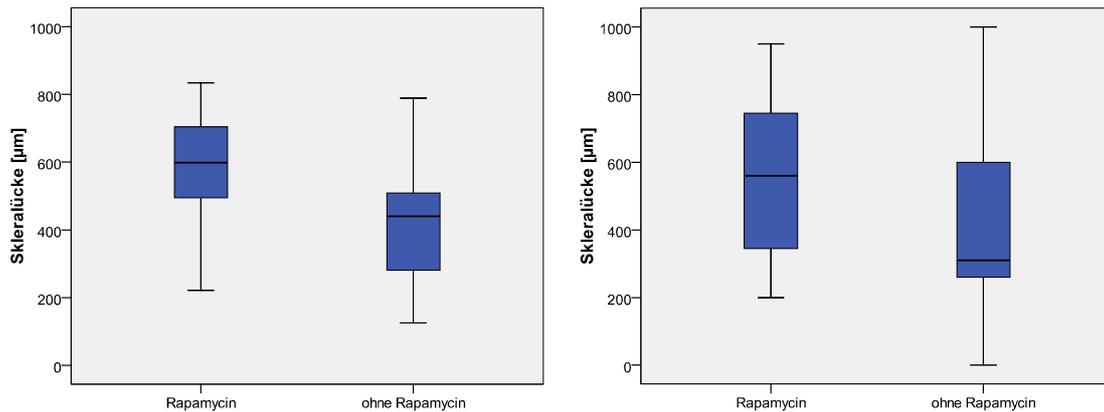


Abb. 3.4.2.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die maximale Ausdehnung der Skleralücke.
Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO

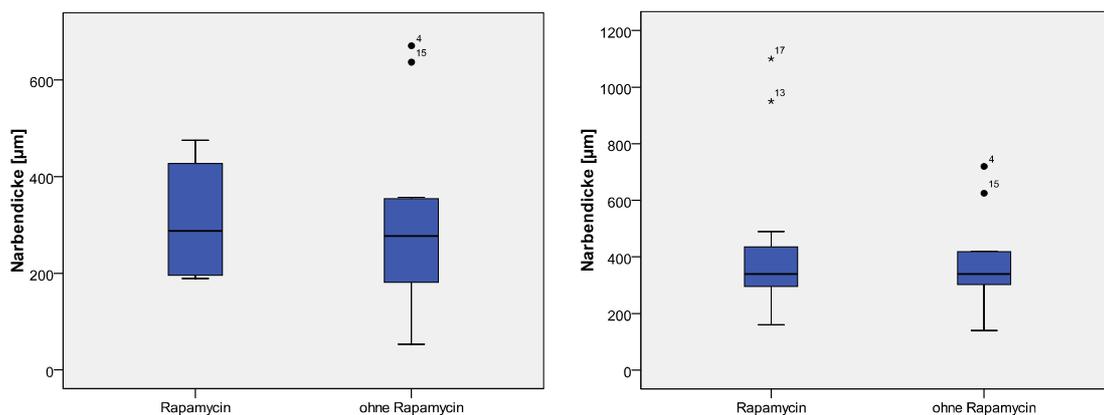


Tab.3.4.2.2: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die maximale Ausdehnung des Skleralücke in μm .
 Linke Abbildung: Untersucher 1, rechte Abbildung: Untersucher 2
 Linkes Diagramm: + $20\mu\text{g}$ Rapamycin gelöst in $200\mu\text{l}$ PBS und 1% DMSO.
 Rechtes Diagramm: - Rapamycin, + $200\mu\text{l}$ PBS und 1% DMSO.
 Untersucher 1: $T = 1,922$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = $0,084$
 Untersucher 2: $T = 1,386$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = $0,196$

Tabelle 3.4.2.2 zeigt die Ausdehnung der Skleralücke als Balkendiagramm. Bei beiden Untersuchern gab es eine Tendenz zu einer größeren Skleralücke unter der Therapie von Rapamycin. Allerdings zeigte sich eine große Schwankungsbreite. Die Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant. (T-Test bei gepaarten Stichproben: Untersucher 1: $T = 1,922$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = $0,084$ Untersucher 2: $T = 1,386$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = $0,196$)

3.4.3 Narbendicke

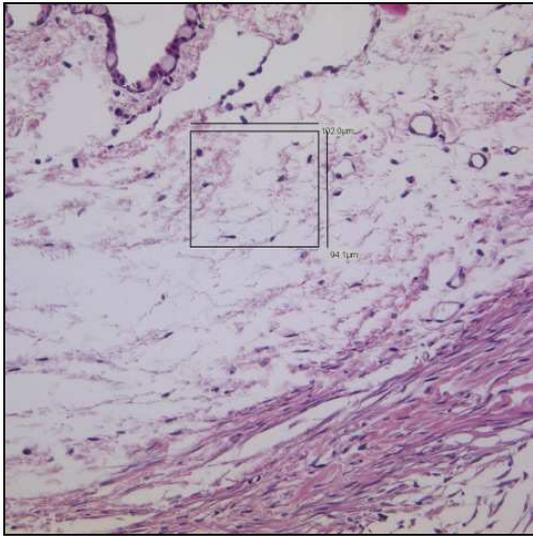
Als weiterer Indikator für den Effekt von Rapamycin auf die Vernarbungsreaktion diente die Narbendicke. Hierbei wurde die Narbendicke in der Mitte des Skleradefektes in den histologischen Präparaten in der van Gieson Färbung (Abbildung 3.4.2.1) gemessen.



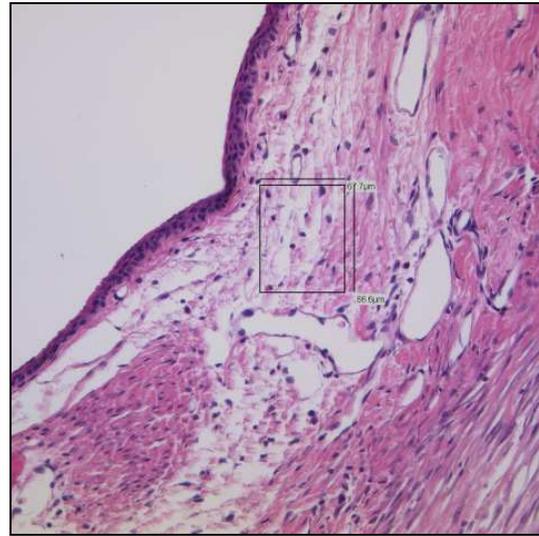
Tab.3.4.3.1 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die maximale Ausdehnung des Narbendicke in μm .
Linke Abbildung: Untersucher 1, rechte Abbildung: Untersucher 2
Linkes Diagramm: + 20 μg Rapamycin gelöst in 200 μl PBS und 1% DMSO.
Rechtes Diagramm: - Rapamycin, + 200 μl PBS und 1% DMSO.
Untersucher 1: $T = -0,036$, $df = 8$, Signifikanz (2-seitig) = 0,972
Untersucher 2: $T = 0,520$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,614

Die Ergebnisse werden in den Balkendiagrammen in Tabelle 3.4.3.1 graphisch dargestellt. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit und ohne Rapamycin behandelten Augen ersichtlich. (T-Test bei gepaarten Stichproben: Untersucher 1: $T = -0,036$, $df = 8$, Signifikanz (2-seitig) = 0,972), Untersucher 2: $T = 0,520$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,614) Bei zwei Augen wurde die Ausdehnung der Narbendicke von einem Untersucher als nicht verwertbar angesehen. Dieses erklärt die Diskrepanz der Anzahl der Augenpaare zwischen beiden Untersuchern.

3.4.4 Episklerale Zelldichte



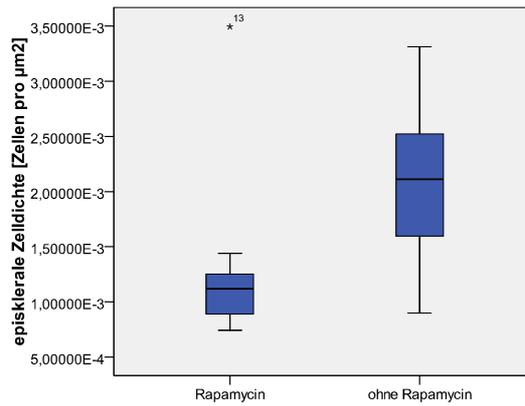
Rapamycin



ohne Rapamycin

Abb. 3.4.4.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die episkleale Zelldichte
Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO

Bei der Untersuchung der episkleralen Zelldichte wurde immer die Region mit der höchsten Zelldichte im Bereich der episkleralen Narbe aufgesucht. Hierzu wurden HE gefärbte histologische Präparate verwendet. Bereiche von angeschnittenen Muskelzellen oder Gefäßendothelzellen wurden dabei nicht berücksichtigt. Hierbei fielen deutliche Unterschiede zwischen den mit Rapamycin behandelten Augen im Vergleich mit der Kontrollgruppe auf. Im Bildvergleich zeigte sich eine niedrigere Zelldichte im Bereich der episkleralen Narbe unter der Therapie mit Rapamycin, wie aus der Abbildung 3.4.4.1 (200-fache Vergrößerung) ersichtlich ist.



Tab.3.4.4.2 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die episklerale Zelldichte in Zellen pro μm^2 .
 Linkes Diagramm: + 20 μg Rapamycin gelöst in 200 μl PBS und 1% DMSO.
 Rechtes Diagramm: - Rapamycin, + 200 μl PBS und 1% DMSO
 Untersucher 1+2: $T = -2,279$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,046

Das Areal mit der größten episkleralen Zelldichte wurde von beiden Untersuchern gemeinsam definiert und mehrfach von beiden Untersuchern unabhängig ausgezählt. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 3.4.4.2 als Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Verringerung der Zellzahl unter der Behandlung mit Rapamycin. (T-Test für gepaarte Stichproben: Untersucher 1+2: $T = -2,279$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,046).

3.4.5 Sklerale Zelldichte

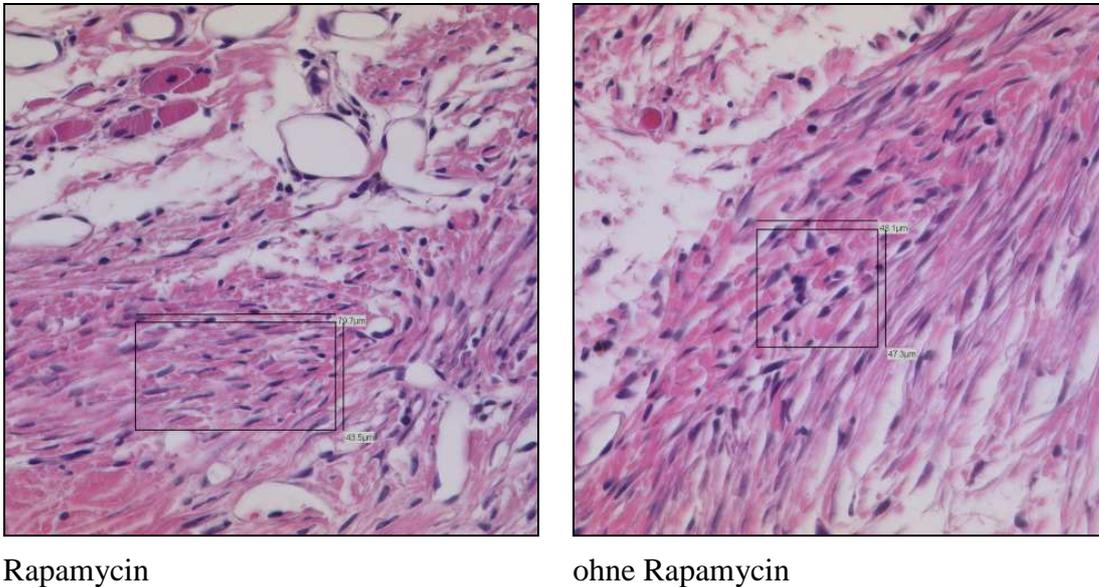
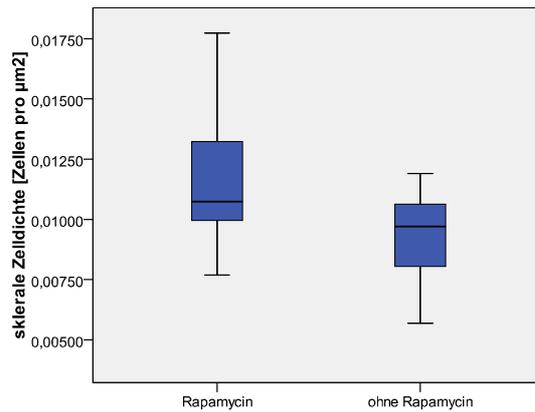


Abb. 3.4.5.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die sklerale Zelldichte
Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO

Neben der episkleralen Zelldichte wurde auch die Region mit der höchsten Zelldichte der Narbe auf Skleraniveau aufgesucht. Hierzu wurden HE gefärbte histologische Präparate verwendet. Gefäßendothelzellen wurden nicht berücksichtigt. Hierbei fielen deutliche Unterschiede zwischen den mit Rapamycin behandelten Augen im Vergleich mit der Kontrollgruppe auf. So erschien die Zelldichte im Bereich der skleralen Narbe unter Therapie mit Rapamycin erhöht, wie aus der Abbildung 3.4.5.1 (400fache Vergrößerung) ersichtlich ist.

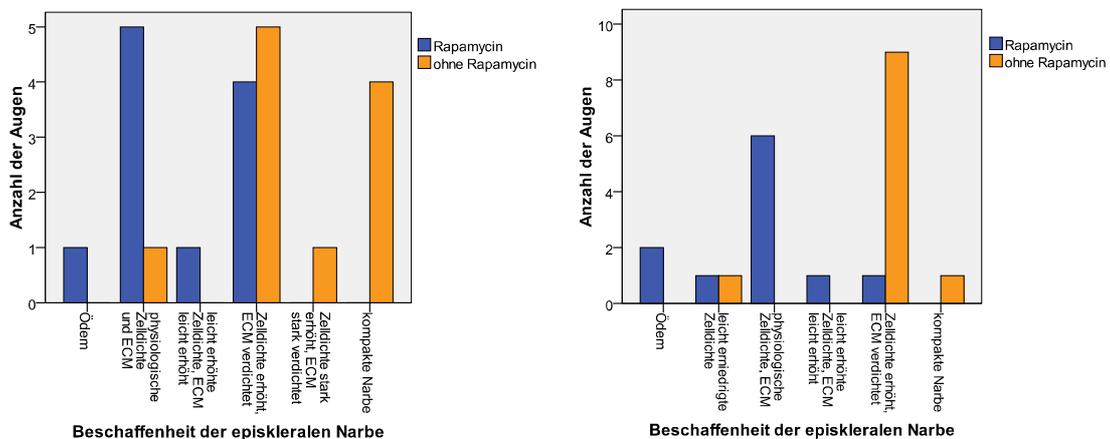


*Tab.3.4.5.2 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die sklerale Zelldichte in Zellen pro μm^2
 Linkes Diagramm: + 20 μg Rapamycin gelöst in 200 μl PBS und 1% DMSO.
 Rechtes Diagramm: - Rapamycin, + 200 μl PBS und 1% DMSO.
 Untersucher 1+2: $T = 4,195$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,002*

Das Areal mit der größten Zelldichte wurde jeweils von beiden Untersuchern gemeinsam definiert und mehrfach von beiden Untersuchern unabhängig ausgezählt. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 3.4.5.2 als Balkendiagramm dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Vergrößerung der Zellzahl unter der Behandlung mit Rapamycin. (T-Test für gepaarte Stichproben: Untersucher 1+2: $T = 4,195$, $df = 10$, Signifikanz (2-seitig) = 0,002.

3.4.6 Beschaffenheit der episkleralen Narbe

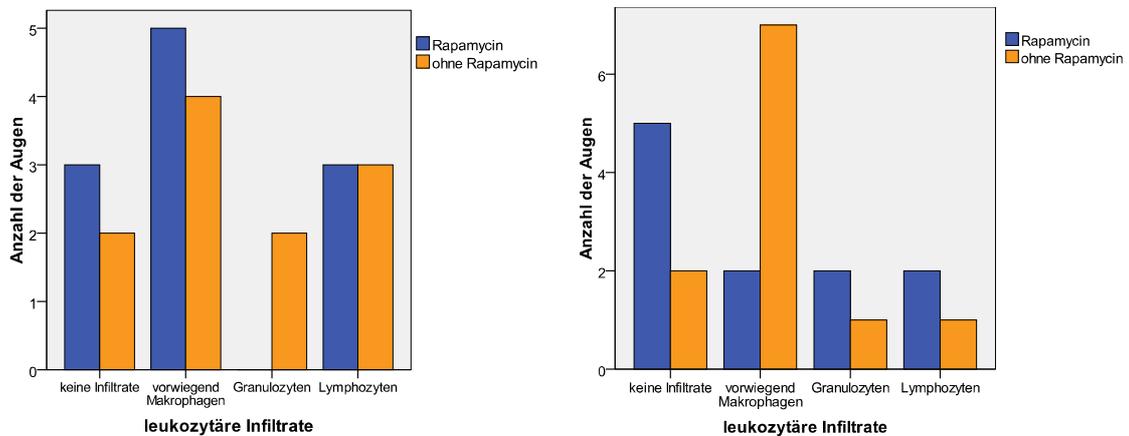
Die Beschaffenheit der episkleralen Narbe wurde in den HE gefärbten histologischen Präparaten (Abb. 3.4.4.1) untersucht. Hierbei wurde die Qualität der Narbe beobachtet, um die Durchlässigkeit der Filtrationszone auf diese Weise einzuschätzen. Bei beiden Untersuchern zeigte sich eine signifikant verringerte Vernarbungsreaktion unter der Therapie von Rapamycin. (Wilcoxon Test: Beschaffenheit der episkleralen Narbe Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,009 $Z = -2,598$, Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,009 $Z = -2,598$) So war die Zelldichte niedriger, die Extrazellulärmatrix weniger dicht oder die Narbe ödematös aufgelockert im Vergleich zu einer erhöhten Zelldichte, einer dichteren Extrazellulärmatrix oder einer kompakten Narbe in der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse beider Untersucher werden in der Tabelle 3.4.6.1 graphisch dargestellt.



Tab.3.4.6.1 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Beschaffenheit der episkleralen Narbe
 Linkes Diagramm: Untersucher 1, rechtes Diagramm: Untersucher 2
 Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,009 $Z = -2,598$
 Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,009 $Z = -2,598$

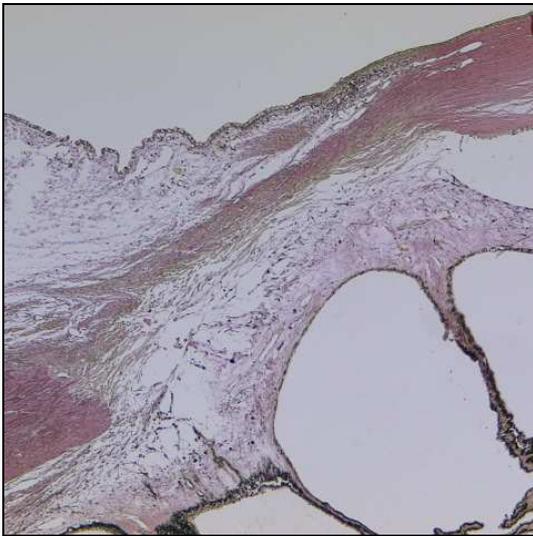
3.4.7 Leukozytäre Infiltrate

Um die Immunreaktion nach der filtrierenden Glaukomchirurgie zu beobachten, wurden die histologischen Schnitte in der HE Färbung (Abb. 3.4.4.1 und 3.4.5.1) auf Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems durchsucht. Wie an Hand der Tabelle 3.4.7 ersichtlich ist, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Rapamycin behandelten Augen und der Kontrollgruppe bei beiden Untersuchern.

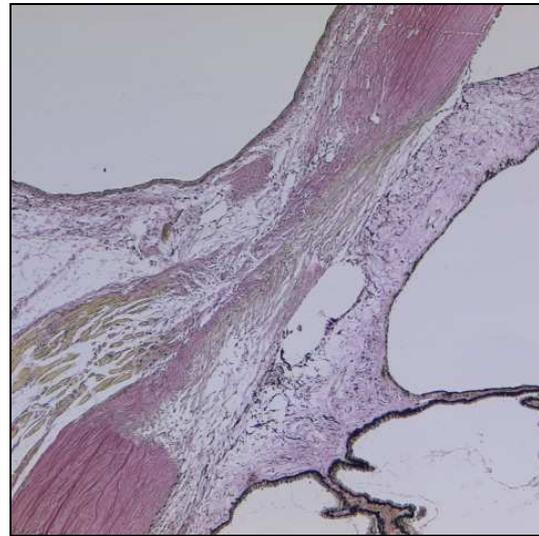


Tab.3.4.7.1 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die leukozytären Infiltrate
 Linkes Diagramm: Untersucher 1, rechtes Diagramm: Untersucher 2
 Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,396 Z= -0,849
 Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,705 Z=-0,378

3.4.8 Narbe in der van Gieson Färbung



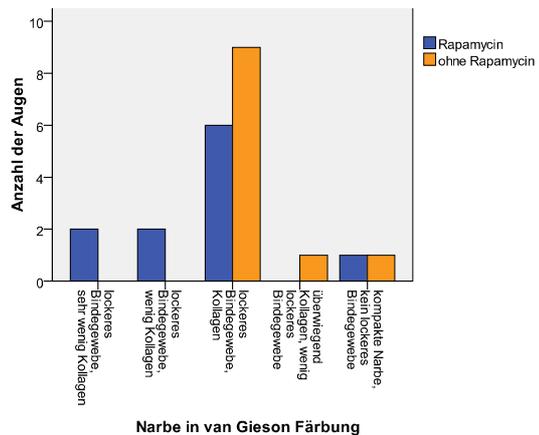
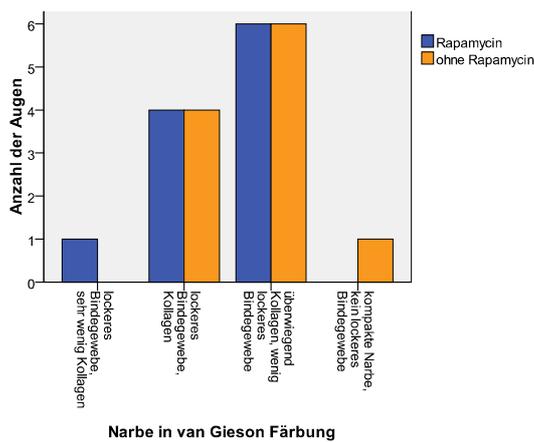
Rapamycin



ohne Rapamycin

*Abb. 3.4.8.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Narbe in der van Gieson Färbung
Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO*

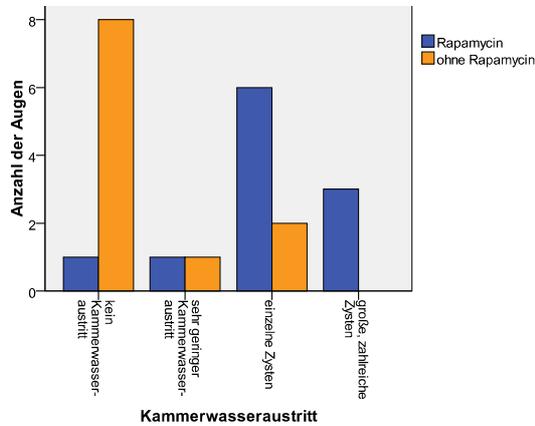
Die Abbildung 3.4.8.1 zeigt die Narbe nach filtrierender Glaukomchirurgie mit und ohne Applikation von Rapamycin in der van Gieson Färbung. Diese Färbung ermöglicht eine qualitative Unterscheidung des neu gebildeten Narbengewebes. So lässt sich das gelb gefärbte, lockere Bindegewebe gut von dem rot angefärbten, dichten, kollagenreichen Bindegewebe differenzieren und somit die Narbenbildung untersuchen. Wie aus der Tabelle 3.4.8.2 ersichtlich ist, zeigt sich bei beiden Untersuchern eine Tendenz zu einer geringeren Vernarbungsreaktion unter der Therapie von Rapamycin, die aber statistisch nicht signifikant ist. Im Wilcoxon Test ergab sich für Untersucher 1 eine asymptotische Signifikanz (2-seitig) von 0,257 $Z = -1,134$, für Untersucher 2 von 0,14 $Z = -1,474$.



Tab.3.4.8.2 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Narbe in der van Gieson Färbung
 Linkes Diagramm: Untersucher 1, rechtes Diagramm: Untersucher 2
 Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,257 Z= -1,134
 Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,14 Z= -1,474

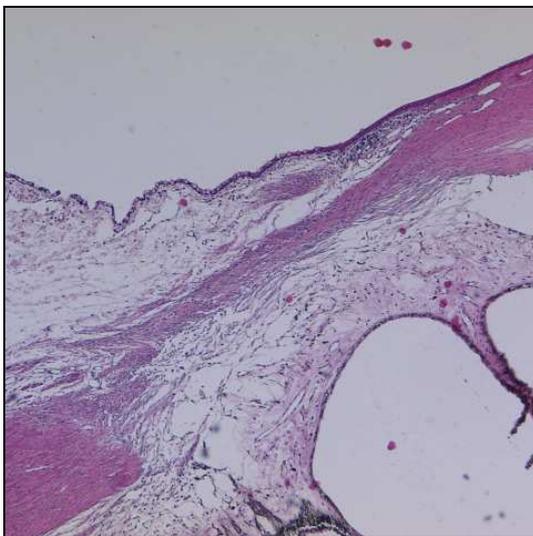
3.4.9 Kammerwasseraustritt

Entscheidend für den Therapieerfolg in der Glaukomchirurgie ist das Fortbestehen der Durchlässigkeit der Filtrationszone. Diese wurde in der van Gieson Färbung untersucht. Der Kammerwasseraustritt imponiert dabei sowohl als pseudozystoide Auflockerung des Bindegewebes, wie auch als flächige Abhebung des episkleralen Narbengewebes. Dieses wird auf den histologischen Schnitten der Abbildung 3.4.8.1 deutlich. Bei dem mit Rapamycin behandelten Auge sieht man eine pseudozystoide Auflockerung auf Skleraniveau, sowie eine ansteigende flächige Abhebung des episkleralen Narbengewebes. In der Tabelle 3.4.9.1 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Unter der Behandlung mit Rapamycin zeigt sich eine vermehrte Zystenbildung, während in der Mehrzahl der Augen der Kontrollgruppe kein Kammerwasseraustritt sichtbar war. Die Ergebnisse beider Untersucher sind statistisch signifikant. Der Wilcoxon Test zeigte für Untersucher 1 eine asymptotische Signifikanz (2-seitig) von 0,04, Z= -2,058, für Untersucher 2 von 0,004 Z= -2,913

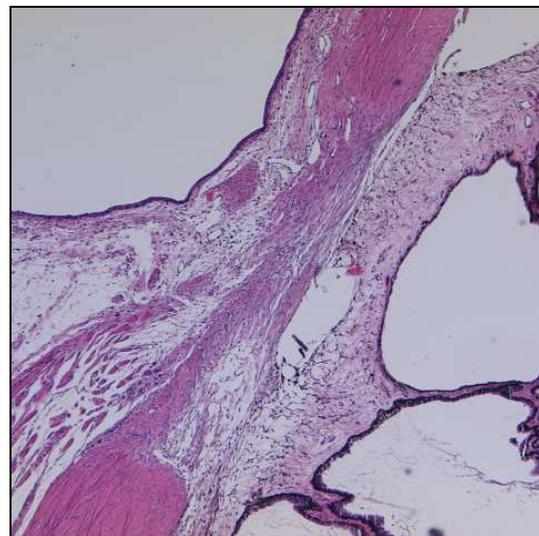


Tab.3.4.9.1 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf den Kammerwasseraustritt
 Linkes Diagramm: Untersucher 1, rechtes Diagramm: Untersucher 2
 Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,04, Z= -2,058
 Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,004 Z= -2,913

3.4.10 Gefäße im Narbenareal



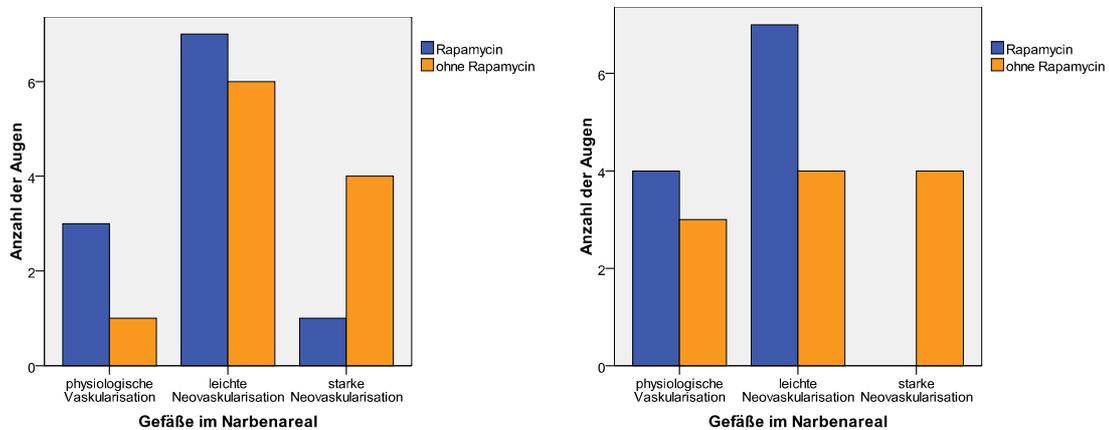
Rapamycin



ohne Rapamycin

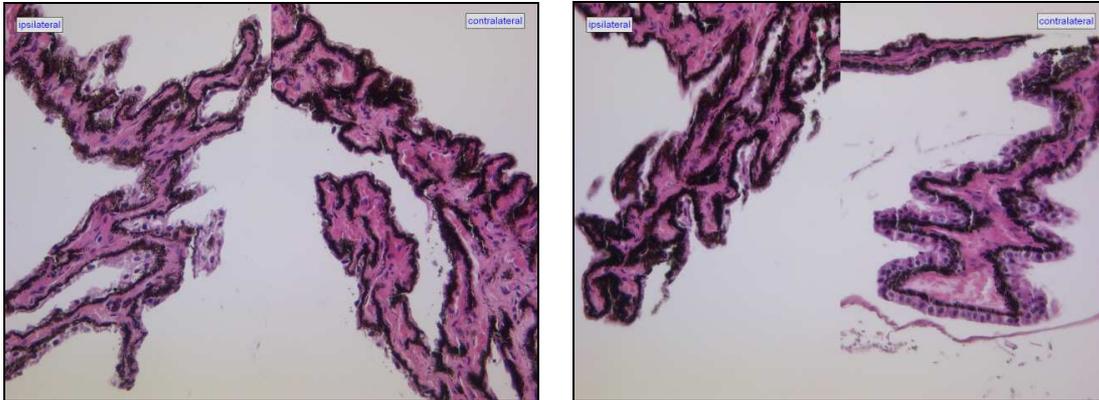
Abb. 3.4.10.1: Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Neovascularisation
 Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
 Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO

Der Effekt von Rapamycin auf die Neovaskularisation wurde in den HE gefärbten Schnitten untersucht, wie in der Abbildung 3.4.10.1 gezeigt. Bei beiden Untersuchern zeigte sich eine physiologische Vaskularisierung bis leichte Neovaskularisation unter der Behandlung der Augen mit Rapamycin, während bei der Kontrollgruppe leichte und starke Neovaskularisationen deutlich häufiger auftraten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3.4.10.2 dargestellt. Die Inhibition der Neovaskularisation war statistisch signifikant. Der Wilcoxon Test ergab für Untersucher 1 eine asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,05, $Z = -1,96$, für Untersucher 2 von 0,025, $Z = -2,236$.



Tab.3.4.10.2 Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die Neovascularisation
Linkes Diagramm: Untersucher 1, rechtes Diagramm: Untersucher 2
Untersucher 1: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,05, $Z = -1,96$
Untersucher 2: Asymptotische Signifikanz (2-seitig) 0,025, $Z = -2,236$

3.4.11 Ziliarkörpertoxizität



Rapamycin

ohne Rapamycin

*Abb. 3.4.11.1: Untersuchung des zytotoxischen Effekts von Rapamycin das Ziliarkörperepithel
Linke Bildhälfte: ipsilateral im Bereich des Goniotomieareals
Rechte Bildhälfte: kontralateral des Goniotomieareals
Linke Abbildung: + 20g Rapamycin gelöst in 200µl PBS und 1% DMSO.
Rechte Abbildung: - Rapamycin, + 200µl PBS und 1% DMSO*

Die zytotoxischen Effekte von Rapamycin auf das Ziliarkörperepithel wurden an Hand der histologischen Schnitte in HE Färbung in 200-facher Vergrößerung untersucht, wie auch in Abb. 3.4.11.1 dargestellt. Hierbei wurde sowohl das Epithel in direkter Nähe zum Goniotomieareal untersucht (linke Bildhälfte), als auch das Epithel im Bereich des gegenüberliegenden Poles (rechte Bildhälfte). So sollte der direkte Effekt des Rapamycins im Applikationsgebiet, sowie die Wirkung vermittelt über eine Diffusion dargestellt werden. Wie auch in der Abb. 3.4.11.1 gezeigt, waren keine zytotoxischen Effekte auf das Ziliarkörperepithel in allen untersuchten Augen sichtbar.

3.5 TUNEL-Reaktion zum Nachweis von Apoptose

In der TUNEL-Reaktion zeigten die untersuchten Proben keine positiven Apoptose Befunde. Allerdings war neben der positiv Kontrolle (DNA'se Verdau) auch die negativ Kontrolle (idem ohne DNA'se) ein positives Signal, so dass die Aussagekraft des Testes unsicher ist. Auf Grund einer Fehlfunktion der Fluoreszenzkamera sind keine auswertbaren Bilder verfügbar. Da alle Augen bereits in Formaldehyd überführt worden waren, war auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Apoptose nicht möglich. Daher wurde die Beurteilung der apoptotischen Aktivität ausschliesslich auf lichtmikroskopische Auswertungen gestützt.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Effektes von Rapamycin auf die postoperative Vernarbung in der Glaukomchirurgie. Hierzu wurde zunächst *in vitro* eine wirksame Konzentration von Rapamycin ermittelt. Dann wurde die Wirkung von Rapamycin im Kaninchenmodell zur filtrierenden Glaukomchirurgie *in vivo* untersucht. Als Kontrolle des klinischen Erfolges diente die Messung des intraokularen Druckes. In den folgenden makroskopischen und histologischen Untersuchungen wurden die Effekte von Rapamycin auf die Narbenbildung untersucht.

4.1 Methodische Problematik

4.1.1 *In vitro* Versuch

4.1.1.1 Zellkultur

Im *in vitro* Versuch wurden primäre humane Tenonfibroblasten genutzt. Die Verwendung von humanen Zellen ermöglicht bereits eine erste Überprüfung der Wirksamkeit von Rapamycin als therapeutisches Agens. Bei dem Tenon-Scratch Versuch handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, welches bereits in Veröffentlichungen der Universitätsaugenklinik Köln beschrieben wurde. So ist der Versuchsaufbau analog zu den Versuchen der zellulären Photoablation⁵⁰ und weiteren Proliferationshemmern der Tenonfibroblasten.^{82,91} Es zeigte sich eine deutliche Proliferationshemmung der Tenonfibroblasten unter der Zugabe von 100-500ng/ml Rapamycin, während eine Inkubation mit 1000ng/ml eine zytotoxische Wirkung hatte. Der antiproliferative Effekt war nach 48 Stunden deutlich sichtbar. Nach einer Woche zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe mehr. Die *in vitro* Versuche zeigten also einen dosis- und zeitabhängigen Effekt von Rapamycin auf Tenonfibroblasten und lieferten die Grundlage für die folgenden *in vivo* Versuche.

4.1.2 *In vivo* Versuch

Bei der Auswahl der Versuchstiere wurde auf das pigmentierte Kaninchen (pigmented Chinchilla bastard) zurückgegriffen. Es handelt sich um ein Tier, dass bei Versuchen am

Auge international eingesetzt wird. Durch die große Ähnlichkeit des Kaninchenauges mit dem humanen Auge sind die gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar und bieten somit eine gute Grundlage für einen späteren möglichen Einsatz des untersuchten Pharmakons beim Menschen. Es wurde auf ein bereits etabliertes Tiermodell zurückgegriffen^{48,90}. Die filtrierende Glaukomchirurgie wurde als ungedeckte Gonioreparation durchgeführt um reproduzierbare Operationsergebnisse – insbesondere einen identischen Durchmesser - zu erzielen. Somit war eine vergleichende quantitative Untersuchung der histologischen Präparate möglich. Die Operation wurde bei allen Tieren von einem erfahrenen Glaukomchirurgen verblindet durchgeführt. Der Stichprobenumfang von 11 Tieren war hinreichend, da eine intraindividuelle Kontrolle der Wirksamkeit über das Partnerauge erfolgte. Bei jeder Untersuchung mit lebenden Tieren ist eine gewisse Schwankungsbreite der Wirkung des Medikaments auf das Gewebe gegeben. Gleichzeitig lassen sich statistisch gesicherte Aussagen finden. Auf größere Versuchstiergruppen wurde zur Schonung von Versuchstieren zum derzeitigen Zeitpunkt verzichtet.

4.1.2.1 Druckmessung

Durch Messung des Augendruckes sollte der Effekt von Rapamycin auf die Überlebenszeit des Filterkissens klinisch untersucht werden. Die Messung des intraokularen Druckes fand unter der Verwendung von Lokalanästhetikum statt, um die Beeinflussung der Ergebnisse durch Stress der Tiere (Kreislauf, Lidspannung) zu verringern. Allerdings handelt es sich hierbei um einen systematischen Fehler, der bei dem hier durchgeführten intraindividuellen Vergleich (gepaarte Stichproben) kaum zur Geltung kommt.

4.1.3 Makroskopie

Bei der makroskopischen Untersuchung der Vernarbungsreaktion nach der Glaukomchirurgie handelt es sich um ein wenig sensitives Verfahren. Insbesondere die kleinen Ausmasse des OP Arealen machten eine Aussage über den Effekt von Rapamycin auf die Vernarbung nicht möglich.

4.1.4 Histologie

Bei der Histologie handelt es sich nach wie vor um den Goldstandard zur morphologischen Auswertung. Nichts desto trotz ist eine gewisse Untersucherabhängigkeit vorhanden.

Durch eine Maskierung bei der Untersuchung konnte diese allerdings vermieden werden. Bei den histologischen Untersuchungen wurde auf im Labor etablierte Standardfärbungen zurückgegriffen, um eine hohe Vergleichbarkeit der verschiedenen Präparate zu erreichen.

4.1.5 TUNEL-Assay

Mit Hilfe des TUNEL Assay sollten apoptotische Zellen dargestellt werden. Leider machte die starke Autofluoreszenz auch in der Negativkontrolle eine Abgrenzung von vitalen und apoptotischen Zellen unmöglich. Auf Grund der Einbettung der Augen in Formaldehyd war auch keine elektronenmikroskopische Untersuchung der Apoptose mehr möglich, so dass die Untersuchung der Zytotoxizität von Rapamycin allein auf die histologische Auswertung gestützt werden musste.

4.2 Eigenschaften von Rapamycin

Rapamycin ist ein weißer, kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 185°C. Strukturell handelt es sich um ein lipophiles carbozyklisches lakton-laktam Makrolidantibiotikum, welches sich in den meisten organischen Lösungsmitteln lösen lässt. Allerdings ist es nahezu unlöslich in Wasser.¹²⁷ Ein weiteres Problem ist die Instabilität des Wirkstoffs. So handelt es sich bei Rapamycin um eine hydrolysierte, oxidierte Verbindung, die unter Lichtexposition zerfallsgefährdet ist.⁹⁴ Die pharmakologischen Eigenschaften von Rapamycin lassen bis heute nur eine systemische Applikation zu. Die relative Bioverfügbarkeit von Rapamycin ist bei oraler Gabe mit etwa 15% sehr gering. Die Spitzenkonzentration wird innerhalb einer Stunde bei 70% der Patienten erreicht und die Halbwertszeit ist mit 62,5 Stunden relativ lang.^{145,151,152} Rapamycin wird in verschiedene Organe und Gewebe verteilt und hat ein großes Verteilungsvolumen von 7 – 15 L/kg. Das geringe therapeutische Fenster zwischen erwünschter Wirkung und unerwünschter Toxizität hat zu einer regelmäßigen Überwachung des Wirkstoffspiegels (Monitoring) im klinischen Alltag geführt.⁸⁷

4.3 Wertung der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

Im *in vitro* Versuch wurde der Effekt verschiedener Dosierungen von Rapamycin auf den Wundverschluss untersucht. Anhand des *in vivo* Versuches wurde der Effekt von Rapamycin auf die Vernarbungsreaktion und den intraokularen Druck nach einer Trabekulektomie untersucht. Hier standen vor allem die antifibrotischen, immunsuppressiven und antiangiogenetischen Eigenschaften im Vordergrund. Weitere Aspekte waren die Untersuchung der Zytotoxizität, sowie der Einfluss der Applikationsform zur Erzielung des gewünschten Effektes.

4.3.1 Antifibrotische Eigenschaften

Um den Wundheilungsprozess zu simulieren wurde in dem *in vitro* Versuch eine artifizielle Läsion in der einschichtigen Zellkultur erzeugt und die Migration von Tenonfibroblasten untersucht. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung auf die Migration der Tenonfibroblasten ohne sichtbare Toxizität bei Konzentrationen von 100-500mg/ml. Die Ergebnisse des *in vitro* Versuchs decken sich auch mit den beschriebenen Effekten auf die Inhibition der Migration durch 10 und 100mg/ml Rapamycin in HUVEC und glatten Muskelendothelzellen^{77,105}. Die FGF β (fibroblast growth factor β) stimulierte Proliferation von Fibroblasten⁴ kann durch Rapamycin ebenfalls inhibiert werden.

Die Untersuchung der histologischen Schnitte zeigte eine signifikant verringerte Zellzahl im Bereich der episkleralen Narbe unter der Behandlung mit Rapamycin. Bei der Untersuchung der Beschaffenheit der episkleralen Narbe zeigte sich auch eine signifikant verringerte Vernarbungsreaktion mit einer weniger dichten Extrazellulärmatrix, niedrigeren Zelldichte oder einer ödematös aufgelockerten Narbengewebe als in der Kontrollgruppe. Dieses korreliert mit der beschriebenen Inhibition der Kollagensynthese durch Rapamycin, welche *in vivo* in der kutanen Wunde der Ratte nachgewiesen werden konnte.¹²¹ Bei der Untersuchung der Zelldichte auf Skleraniveau haben wir interessanterweise eine signifikante Zunahme der Zellzahl in den mit Rapamycin behandelten Augen feststellen können. Ein vergleichbarer Effekt ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

4.3.2 Immunsuppressive Eigenschaften

Um die immunsuppressiven Eigenschaften von Rapamycin zu beobachten, wurden die histologischen Präparate auf leukozytäre Infiltrate, sowie Zellen des innatens und adaptiven Immunsystems durchsucht. Auch wenn sich eine Tendenz zu einer geringeren Immunantwort zeigte, so war diese nicht statistisch signifikant. Diese Tendenz deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Effekten von Rapamycin. So ist die antiproliferative Wirkung von Rapamycin auf T- und B-Lymphozyten bekannt. Die Aktivierung dieser Zellen konnte durch die Inkubation mit Rapamycin gehemmt werden.⁷² Auch wurde die Abstoßungsreaktion eines Corneatransplantates im Kaninchenmodell unter der Therapie mit Rapamycinaugentropfen deutlich verlängert.¹³⁴

4.3.3 Antiangiogenetische Eigenschaften

In unseren Versuchen zeigte sich eine Inhibition der Neovaskularisierung unter der Behandlung mit Rapamycin. Dieses Ergebnis ist statistisch signifikant und deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Veröffentlichungen in der Augenheilkunde.

So zeigte sich eine deutliche Verringerung der Neovaskularisation der Cornea im Mausmodell nach einer Verätzung mit NaOH, die wahrscheinlich durch die Inhibition von VEGF vermittelt wird. Rapamycin wurde in einer Dosierung von 2mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert.⁷⁸

Diese antiangiogenetische Wirkung wurde auch beim Allotransplantat der Cornea der Ratte beschrieben. Eine intramuskuläre Injektion von 2mg und 4mg Rapamycin pro Kilogramm Körpergewicht über 25 Tage führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten Unterschied zur Vergleichsgruppe bis zum 62. postoperativen Tag.⁹⁸

Sowohl im Mausmodell der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) und der Frühgeborenenretinopathie (ROP) konnte eine Inhibition der Neovaskularisation durch Rapamycin erreicht werden. Auch hier zeigte sich kein Unterschied bei der intraperitonealen Gabe in zwei Dosierungen von 2 mg und 4mg pro Kilogramm Körpergewicht.²⁸

4.3.4 Einfluss von Rapamycin auf den intraokularen Druck

In unserem Versuch haben wir eine subconjunktivale Injektion mit Rapamycin durchgeführt. Als Verlaufparameter wurde der intraokulare Druck gemessen. Die mit Rapamycin behandelten Augen zeigten am 3. postoperativen Tag einen signifikant niedrigeren intraokularen Druck als die jeweiligen Kontrollaugen. In den Augendruckmessungen zu späteren Zeitpunkten ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem behandelten und den unbehandelten Augen ausmachen. Die Senkung des intraokularen Druckes lässt auf eine erfolgreiche Inhibition der Vernarbung des Goniotomieareals schließen, die aber zeitlich limitiert ist. Ein solcher Effekt ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Bei der Untersuchung der histologischen Präparate auf den Kammerwasseraustritt - also auf das histologische Korrelat einer erfolgreichen Glaukomoperation - konnten wir ebenfalls eine signifikant vergrößerte Durchlässigkeit der Filtrationszone nachweisen. Dieses unterstützt somit unsere klinischen Ergebnisse.

4.3.5 Einfluss von Applikationsort, Applikationsform und Applikationsdauer

In unseren Versuchen wurde Rapamycin im Rahmen der filtrierenden Glaukomoperation subconjunctival appliziert und führte zu einer erfolgreichen Drucksenkung nach 3 Tagen. Für die zeitliche Limitierung kommen verschiedene Variablen in Frage. Dazu gehören neben den biochemischen Eigenschaften von Rapamycin auch die Konzentration des Wirkstoffs, die Applikationsform, der Applikationsort und die Applikationsdauer.

Die Anwendung von Rapamycin am Auge ist durch seine biochemischen Eigenschaften erschwert. Zum einen könnte die Photosensitivität von Rapamycin zu einer Degradation unter dem Lichteinfall im Auge führen.⁹⁵ Zum anderen handelt es sich bei Rapamycin um ein lipophiles Medikament, welches sich schlecht im Kammerwasser verteilt. In einem aktuellen *in vitro* Versuch konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen von Rapamycin ohne und mit Lichtexposition in einem Zeitraum von 90 Tagen erzielt werden. Bedeutender scheint da die geringe Löslichkeit im Kammerwasser zu sein, die gemeinsam mit dem großen Turn-Over des Kammerwassers zu geringen Konzentrationen und inkonsistenten Ergebnissen im Tierversuch geführt haben.³²

Eine weitere Variable ist die verwendete Dosis des Wirkstoffs. Analog zu den bereits beschriebenen intraokularen Dosen von Rapamycin im Kaninchen von 20 bis 1000 μg ⁸⁴ bzw. 500 μg ¹³³ wurden hier 20 μg subconjunktival appliziert.

Auch die Applikationsform und der Applikationsort spielen eine wichtige Rolle. So führte die subconjunktivale Injektion von 10mg Rapamycin im Pferdeauge weder nach 7 noch nach 21 Tagen zu einem nachweisbaren Medikamentenspiegel im Kammerwasser. Intravitreale Injektionen von 5mg und 10mg Rapamycin führten zu Kammerwasserkonzentrationen von mehr als 15 ng/ml und erreichten somit therapeutische Level.³¹ Eine weitere Möglichkeit ist die topische Applikation von Rapamycin. So konnte die Abstoßungsreaktion eines Corneatransplantates im Kaninchenmodell unter der Therapie mit Rapamycinaugentropfen deutlich verlängert und die Neovaskularisation verringert werden.¹³² Durch eine nichtinvasive und einfach anzuwendende Therapie ist so auch eine längere Applikationsdauer zu erreichen. Allerdings ließen sich auch hier keine Medikamentenspiegel im Kammerwasser nachweisen. Eine lange Applikationsdauer und gleichzeitig eine wirksame intraokulare Rapamycinkonzentration lassen sich hingegen durch ein implantierbares DDS (drug delivery system) erreichen. Rapamycin-DDS systeme konnten in Kaninchen die Abstoßung und der Neovaskularisierung von allotransplantierten Hornhäuten inhibieren. Dabei blieben 8 von 10 Transplantaten über einen Zeitraum von 90 Tagen klar, während sich unter der Therapie mit Rapamycin-Augentropfen nach 30 Tagen eine Abstoßungsreaktion zeigte. Zur Herstellung des DDS wurden hier 0,5 mg Rapamycin an den Carrier PGLC (glycoglide-co-lactide-caprolactone copolymer) gebunden und in Filme von 3 x 1 x 0,5 mm gepresst und implantiert. Die mit der Spaltlampe makroskopisch sichtbare Biodegradation mit kontinuierlicher Wirkstofffreisetzung war nach 120 Tagen abgeschlossen.¹³¹

Um den deutlichen Effekt von Rapamycin auf den intraokularen Druck nach 3 Tagen zu prolongieren wäre also eine mehrmalige subconjunktivale Injektion denkbar. Eine weitere Möglichkeit eine konstante Applikation durch ein DDS, welches im Rahmen der Trabekulektomie in die Vorderkammer eingebracht werden könnte.

4.3.6 Zytotoxizität und Apoptose

Eine bedeutende Rolle für den Einsatz von Rapamycin in der Glaukomchirurgie spielt auch das Nebenwirkungsprofil. In der Zellkultur zeigte sich bei Konzentrationen von 50-500ng/ml kein Anhalt für Zytotoxizität. Erst bei einer Konzentration von 1000ng/ml zeigte sich eine Steigerung des Zelluntergangs. Die antiproliferativen Effekte zeigten sich bereits bei einer Konzentration von 100ng/ml. Entsprechend des Verteilungsvolumens des Kammerwassers wurden 20µg Rapamycin pro Kaninchenauge eingesetzt. Bei der histologischen Untersuchung lag unser besonderes Augenmerk auf der Untersuchung des Ziliarkörperepithels. Auch bei diesem sehr empfindlichen Epithel ließen sich keine Anzeichen der Zytotoxizität ausmachen. Dieses entspricht den aus der Literatur bekannten Ergebnissen. So zeigten sich bei der intravitrealen Verabreichung von Rapamycin im Kaninchen bei einer intraokularen Dosis von 20 -1000µg keine histologischen Anzeichen von Toxizität in einem Zeitraum von 14 Tagen.⁸⁵ Die Hornhaut war klar und Hornhautepithel wie Endothel vital. Die Linse war intakt und die Netzhaut ohne Zeichen einer Degeneration⁸⁶ Auch beim Pferd wurden keine Hinweise auf Toxizität gefunden. Hierbei wurden – angepasst an das 25fach größere Volumen des Bulbus im Vergleich zum Kaninchen – eine Dosis von 5 und 10mg Rapamycin sowohl intravitreal, wie auch subconjunktival gegeben.³³.

Mit der TUNEL-Reaktion sollte die Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose untersucht werden. Leider war auf Grund einer deutlichen Negativkontrolle keine sichere Aussage zu treffen. Bei einer bereits erfolgten Einbettung in Formaldehyd war eine elektronenmikroskopische Untersuchung der Apoptose nicht möglich. Die Untersuchung musste somit auf der Grundlage der histologischen Präparate erfolgen. Hier zeigte sich keine gesteigerte Apoptoserate. Derzeit wird die Rolle von Rapamycin auf die Apoptose in der Literatur kontrovers diskutiert. Interessant ist dabei die Induktion der Autophagie durch Rapamycin. Bei der stressinduzierten Autophagie handelt es sich um eine schützende Reaktion der Zelle. Im Falle von Rapamycin scheint die Induktion der Autophagie für die antitumor- und neuroprotektiven Effekte mit verantwortlich zu sein.^{62 117} Allerdings kann eine exzessive Autophagie zum Zelltod führen. So gibt es eine direkte Beziehung zwischen Autophagie und Apoptose.¹⁰⁴ Es wird aber auch eine direkte Wirkung auf die JNK-Signalweg-vermittelte Apoptose über die Inhibition von mTor durch Rapamycin beschrieben.⁶⁰ Im *in vitro* Experiment mit Rapamycin zeigte sich eine dosisabhängige

Zunahme der apoptotischen Zellen von 1,9fach (10ng/ml), 2,1fach (100ng/ml) bis 2,6fach(1000ng/ml).⁷⁹

4.4 Weitere mögliche Untersuchungen

Unsere Ergebnisse zeigten eine erfolgreiche postoperative Drucksenkung. Allerdings war dieser Effekt zeitlich limitiert. Dieser Senkung des intraokularen Drucks liegen vorwiegend die antifibrotischen Eigenschaften von Rapamycin zu Grunde. In weiterführenden Untersuchungen könnte eine andere Applikationsart verwendet werden um diesen Effekt zu prolongieren. Es wäre eine mehrmalige subconjunktionale Injektion möglich, um einen Wirkspiegel von Rapamycin über einen längeren Zeitraum sicherzustellen. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines konstant eluierenden DDS, welches im Rahmen der Goniotomie eingebracht werden könnte. Hier könnten konstante Wirkspiegel über einen langen Zeitraum ohne erneute Intervention erreicht werden. In unseren Untersuchungen zeigten sich keine Zytotoxizität und keine Steigerung der Apoptoserate. Dennoch wäre eine elektronenmikroskopische Untersuchung des Ziliarkörperepithels wünschenswert, um - auch auf dieser Ebene - einen Vergleich mit Mitomycin C, dem derzeitigen Goldstandard in der Glaukomchirurgie, herzustellen. Bei den mit Mitomycin C behandelten Augen zeigten sich toxische Veränderungen in Form eines Verlustes der apikalen Mikrovilli, einer Bildung intrazellulärer Vakuolen und einer Lyse des Ziliarkörperepithels und stromaler Fibroblasten.¹²⁶ Ein bisher noch unbekannter Effekt von Rapamycin ist die signifikante Erhöhung der Zellzahl im Rahmen der Vernarbungsreaktion auf Skleraniveau. Dieser Effekt sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung des Effekts von Rapamycin auf die postoperative Vernarbung in der Glaukomchirurgie. Dazu wurde zunächst in der Zellkultur mit humanen Tenonfibroblasten eine wirksame antiproliferative Konzentration von Rapamycin gefunden. Im folgenden Tierversuch wurden 12 Kaninchen untersucht. An beiden Augen wurde eine filtrierende Glaukomchirurgie durchgeführt. Im Rahmen der Operation wurde bei den rechten Augen Rapamycin subconjunktival appliziert, während die linken Augen als Kontrollgruppe fungierten. Als klinische Verlaufskontrolle diente die Messung des intraokularen Druckes im Verlauf von 28 Tagen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach erfolgter Enukleation die makroskopischen und histomorphologischen Veränderungen der mit Rapamycin behandelten Augen untersucht und mit den unbehandelten Kontrollaugen verglichen. Hierbei wurden vor allem die antiproliferativen, die antiangiogenetischen und immunsuppressiven Eigenschaften von Rapamycin untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Verringerung der Zellzahl in der episkleralen Narbe und eine signifikant verringerte Vernarbungsreaktion mit einer weniger dichten Extrazellulärmatrix, niedrigeren Zelldichte oder einem ödematös aufgelockerten Narbengewebe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Diese antiproliferativen Effekte bilden die Basis für einen erfolgreichen Einsatz von Rapamycin in der Glaukomchirurgie. Interessanterweise fanden wir auf Skleraniveau einen entgegengesetzten Effekt im Sinne einer signifikanten Zunahme der Zellzahl. In unseren Versuchen zeigte sich auch eine signifikante Inhibition der Neovaskularisierung unter der Behandlung mit Rapamycin, während die Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften von Rapamycin keine signifikanten Unterschiede offenbarte. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte keinen Anhalt für Ziliarkörpertoxizität unter der Therapie mit Rapamycin. Bei der Untersuchung der histologischen Präparate auf den Kammerwasseraustritt - also auf das histologische Korrelat einer erfolgreichen Glaukomoperation - konnte eine signifikant vergrößerte Durchlässigkeit der Filtrationszone nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte bei der Untersuchung des intraokularen Drucks auch klinisch nachgewiesen werden. So zeigten die mit Rapamycin behandelten Augen am 3. postoperativen Tag einen signifikant niedrigeren intraokularen Druck als die jeweiligen Kontrollaugen. In den Augendruckmessungen zu späteren Zeitpunkten ließ sich kein Unterschied zwischen dem behandelten und dem unbehandelten Auge mehr ausmachen. Die Senkung des intraokularen Druckes lässt auf eine erfolgreiche Inhibition der Vernarbung des

Goniotomieareals schliessen, die aber zeitlich limitiert ist. Ein solcher Effekt ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Auf dieser Basis kann eine Prolongation dieser Wirkung durch eine veränderte Applikationsform oder Applikationsdauer in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham RT, Eng CH. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology
5. Expert Opin Ther Targets 2008;12:209-222.
2. Abraham RT, Eng CH. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in oncology
5. Expert Opin Ther Targets 2008;12:209-222.
3. Addicks EM, Quigley HA, Green WR, Robin AL. Histologic characteristics of filtering blebs in glaucomatous eyes. Arch Ophthalmol 1983;101:795-798.
4. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor beta-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. Transplant Proc 1991;23:2833-2836.
5. Akselband Y, Harding MW, Nelson PA. Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor beta-stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts. Transplant Proc 1991;23:2833-2836.
6. Anderson DR, Hendrickson A. Effect of intraocular pressure on rapid axoplasmic transport in monkey optic nerve. Invest Ophthalmol 1974;13:771-783.
7. Attur MG, Patel R, Thakker G, Vyas P, Levartovsky D, Patel P, Naqvi S, Raza R, Patel K, Abramson D, Bruno G, Abramson SB, Amin AR. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production
4. Inflamm Res 2000;49:20-26.
8. Bansal RK, Gupta A. 5-fluorouracil in trabeculectomy for patients under the age of 40 years. Ophthalmic Surg 1992;23:278-280.
9. Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing
23. Int J Low Extrem Wounds 2003;2:107-120.
10. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, Schmitt I, Wullner U, Evert BO, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins
12. Hum Mol Genet 2006;15:433-442.
11. Bergstrom TJ, Wilkinson WS, Skuta GL, Watnick RL, Elnor VM. The effects of subconjunctival mitomycin-C on glaucoma filtration surgery in rabbits. Arch Ophthalmol 1991;109:1725-1730.
12. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy
17. Nat Rev Cancer 2004;4:335-348.

13. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy
17. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335-348.
14. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy
17. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335-348.
15. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy
17. *Nat Rev Cancer* 2004;4:335-348.
16. Boehm M, Nabel EG. Cell cycle and cell migration: new pieces to the puzzle
15. *Circulation* 2001;103:2879-2881.
17. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, von Der Leyen HE, Morris RE, Dzau VJ. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1152-1158.
18. Buller CL, Loberg RD, Fan MH, Zhu Q, Park JL, Vesely E, Inoki K, Guan KL, Brosius FC, III. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression
1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C836-C843.
19. Cairns JE. Trabeculectomy. Preliminary report of a new method
7. *Am J Ophthalmol* 1968;66:673-679.
20. Camardo J. The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation
1. *Transplant Proc* 2003;35:18S-24S.
21. Camardo J. The Rapamune era of immunosuppression 2003: the journey from the laboratory to clinical transplantation
1. *Transplant Proc* 2003;35:18S-24S.
22. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation* 1995;59:390-395.
23. Chen CW, Huang HT, Bair JS, Lee CC. Trabeculectomy with Simultaneous Topical Application of Mitomycin-C in Refractory Glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology* 1990;6:175-182.
24. Costa VP, Moster MR, Wilson RP, Schmidt CM, Gandham S, Smith M. Effects of topical mitomycin C on primary trabeculectomies and combined procedures. *Br J Ophthalmol* 1993;77:693-697.
25. Costa VP, Spaeth GL, Eiferman RA, Orengonania S. Wound-Healing Modulation in Glaucoma Filtration Surgery. *Ophthalmic Surgery and Lasers* 1993;24:152-170.

26. de Vries PJ. What can we learn from tuberous sclerosis complex (TSC) about autism?
 1. *Journal of Intellectual Disability Research* 2008;52:818.
27. Dejneka NS, Kuroki AM, Fosnot J, Tang W, Tolentino MJ, Bennett J. Systemic rapamycin inhibits retinal and choroidal neovascularization in mice. *Mol Vis* 2004;10:964-972.
28. Dejneka NS, Kuroki AM, Fosnot J, Tang W, Tolentino MJ, Bennett J. Systemic rapamycin inhibits retinal and choroidal neovascularization in mice. *Mol Vis* 2004;10:964-972.
29. Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation
 1. *EMBO Rep* 2007;8:864-870.
30. Diestelhorst M, Khalili MA, Krieglstein GK. Trabeculectomy: a retrospective follow-up of 700 eyes. *International Ophthalmology* 1998;22:211-220.
31. Douglas LC, Yi NY, Davis JL, Salmon JH, Gilger BC. Ocular toxicity and distribution of subconjunctival and intravitreal rapamycin in horses
 1. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31:511-516.
32. Douglas LC, Yi NY, Davis JL, Salmon JH, Gilger BC. Ocular toxicity and distribution of subconjunctival and intravitreal rapamycin in horses
 1. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31:511-516.
33. Douglas LC, Yi NY, Davis JL, Salmon JH, Gilger BC. Ocular toxicity and distribution of subconjunctival and intravitreal rapamycin in horses
 1. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31:511-516.
34. Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ. Reversal of learning deficits in a *Tsc2*^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis
 1. *Nat Med* 2008;14:843-848.
35. El-Harazi SM, Feldman RM, Villanueva G, Carter-Dawson L, Mietz H, Chuang AZ. Low-dose postoperative transconjunctival application of mitomycin C in rabbit trabeculectomy
 3. *J Glaucoma* 1999;8:374-379.
36. El-Harazi SM, Feldman RM, Villanueva G, Carter-Dawson L, Mietz H, Chuang AZ. Low-dose postoperative transconjunctival application of mitomycin C in rabbit trabeculectomy
 3. *J Glaucoma* 1999;8:374-379.
37. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472-1487.

38. Furic L, Livingstone M, Dowling RJ, Sonenberg N. Targeting mtor-dependent tumours with specific inhibitors: a model for personalized medicine based on molecular diagnoses. *Curr Oncol* 2009;16:59-61.
39. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle
3. *Circulation* 1999;99:2164-2170.
40. Geerts AM, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Leybaert L, Van Steenkiste C, De Vos M, Colle I. Rapamycin prevents mesenteric neo-angiogenesis and reduces splanchnic blood flow in portal hypertensive mice. *Hepatology Research* 2008;38:1130-1139.
41. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. mTOR signaling to translation
5. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004;279:169-197.
42. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques
3. *Lab Invest* 1994;71:219-225.
43. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo
5. *Transplant Proc* 1993;25:770-771.
44. Grehn F. [Surgery of primary open angle glaucoma]
8. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2008;225:30-38.
45. Grisanti S, Diestelhorst M, Heimann K, Krieglstein G. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in a rabbit model of filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1353-1359.
46. Grisanti S, Diestelhorst M, Heimann K, Krieglstein G. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in a rabbit model of filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1353-1359.
47. Grisanti S, Diestelhorst M, Heimann K, Krieglstein G. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in a rabbit model of filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1353-1359.
48. Grisanti S, Diestelhorst M, Heimann K, Krieglstein G. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in a rabbit model of filtration surgery. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1353-1359.
49. Grisanti S, Gralla A, Maurer P, Diestelhorst M, Krieglstein G, Heimann K. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in filtration surgery: in vitro studies. *Exp Eye Res* 2000;70:145-152.

50. Grisanti S, Gralla A, Maurer P, Diestelhorst M, Krieglstein G, Heimann K. Cellular photoablation to control postoperative fibrosis in filtration surgery: in vitro studies. *Exp Eye Res* 2000;70:145-152.
51. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 2002;8:128-135.
52. Hatfield SM, Mynderse JS, Roehm NW. Rapamycin and FK506 differentially inhibit mast cell cytokine production and cytokine-induced proliferation and act as reciprocal antagonists
1. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:970-976.
53. Hentges KE, Sirry B, Gingeras AC, Sarbassov D, Sonenberg N, Sabatini D, Peterson AS. FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse
10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13796-13801.
54. Heuer DK, Parrish RK, Gressel MG, Hodapp E, Desjardins DC, Skuta GL, Palmberg PF, Nevarez JA, Rockwood EJ. 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. III. Intermediate follow-up of a pilot study. *Ophthalmology* 1986;93:1537-1546.
55. Heuer DK, Parrish RK, Gressel MG, Hodapp E, Desjardins DC, Skuta GL, Palmberg PF, Nevarez JA, Rockwood EJ. 5-Fluorouracil and glaucoma filtering surgery. III. Intermediate follow-up of a pilot study. *Ophthalmology* 1986;93:1537-1546.
56. Heuer DK, Parrish RK, Gressel MG, Hodapp E, Palmberg PF, Anderson DR. 5-Fluorouracil and Glaucoma Filtering Surgery .2. A Pilot-Study. *Ophthalmology* 1984;91:384-394.
57. Hitchings RA, Grierson I. Clinico Pathological Correlation in Eyes with Failed Fistulizing Surgery. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom* 1983;103:84-88.
58. Holmes DR, Jr., Leon MB, Moses JW, Popma JJ, Cutlip D, Fitzgerald PJ, Brown C, Fischell T, Wong SC, Midei M, Snead D, Kuntz RE. Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis
12. *Circulation* 2004;109:634-640.
59. Huang S, Shu L, Dilling MB, Easton J, Harwood FC, Ichijo H, Houghton PJ. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1). *Mol Cell* 2003;11:1491-1501.

60. Huang S, Shu L, Dilling MB, Easton J, Harwood FC, Ichijo H, Houghton PJ. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1). *Mol Cell* 2003;11:1491-1501.
61. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:2271-2281.
62. Iwamaru A, Kondo Y, Iwado E, Aoki H, Fujiwara K, Yokoyama T, Mills GB, Kondo S. Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* 2007;26:1840-1851.
63. Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:117-126.
64. Jain S, Bicknell GR, Whiting PH, Nicholson ML. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001;33:556-558.
65. Jampel HD, Jabs DA, Quigley HA. Trabeculectomy with 5-fluorouracil for adult inflammatory glaucoma. *Am J Ophthalmol* 1990;109:168-173.
66. Jampel HD, Mcguigan LJB, Dunkelberger GR, Lhernault NL, Quigley HA. Cellular Proliferation After Experimental Glaucoma Filtration Surgery. *Archives of Ophthalmology* 1988;106:89-94.
67. Jordan JF. Modulation of wound healing in filtration surgery for glaucoma 1. *Ophthalmologie* 2003;100:340-359.
68. Jordan JF, Dietlein TS, Krieglstein GK. Medikamentöse Glaukom-Therapie 12. *Arzneimitteltherapie* 2007;25:54-62.
69. Joseph JP, Miller MH, Hitchings RA. Wound-Healing As A Barrier to Successful Filtration Surgery. *Eye* 1988;2:S113-S123.
70. Kalesnykas G, Uusitalo H. Comparison of simultaneous readings of intraocular pressure in rabbits using Perkins handheld, Tono-Pen XL, and TonoVet tonometers 10. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:761-762.
71. Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* 1991;72:544-549.
72. Kay JE, Kromwel L, Doe SE, Denyer M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* 1991;72:544-549.
73. Kelbaek H, Klovgaard L, Helqvist S, Lassen JF, Krusell LR, Engstrom T, Botker HE, Jorgensen E, Saunamaki K, Aljabbari S, Thayssen P, Galloe A, Jensen

GV, Thuesen L. Long-term outcome in patients treated with sirolimus-eluting stents in complex coronary artery lesions: 3-year results of the SCANDSTENT (Stenting Coronary Arteries in Non-Stress/Benestent Disease) trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2011-2016.

74. Kelbaek H, Thuesen L, Helqvist S, Klovgaard L, Jorgensen E, Aljabbari S, Saunamaki K, Krusell LR, Jensen GV, Botker HE, Lassen JF, Andersen HR, Thayssen P, Galloe A, van WA. The Stenting Coronary Arteries in Non-stress/benestent Disease (SCANDSTENT) trial
14. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:449-455.
75. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Smith MF, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mitomycin C on glaucoma filtration surgery in the rabbit. *Ophthalmology* 1993;100:367-372.
76. Kitazawa Y, Kawase K, Matsushita H, Minobe M. Trabeculectomy with mitomycin. A comparative study with fluorouracil. *Arch Ophthalmol* 1991;109:1693-1698.
77. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:454-460.
78. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:454-460.
79. Kwon YS, Hong HS, Kim JC, Shin JS, Son Y. Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:454-460.
80. Lee DA, Hersh P, Kersten D, Melamed S. Complications of subconjunctival 5-fluorouracil following glaucoma filtering surgery. *Ophthalmic Surg* 1987;18:187-190.
81. Lee DA, Shapourifar-Tehrani S, Kitada S. The effect of 5-fluorouracil and cytarabine on human fibroblasts from Tenon's capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1848-1855.
82. Lin X, Yu M, Wu K, Yuan H, Zhong H. Pirfenidone inhibits proliferation, migration, and collagen contraction of Human Tenon's Fibroblasts in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009.
83. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1
1. *Mol Cell Biol* 1996;16:6744-6751.
84. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M, Chevez-Barrios P, Takahashi W. Testing intravitreal toxicity of rapamycin in rabbit eyes
1. *Arq Bras Oftalmol* 2009;72:18-22.

85. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M, Chevez-Barrios P, Takahashi W. Testing intravitreal toxicity of rapamycin in rabbit eyes
1. *Arq Bras Oftalmol* 2009;72:18-22.
86. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M, Hefez J. Intravitreal Toxicity of Rapamycin
4. *Invest ophthalmol Vis Sci* 2006;47.
87. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Toxicity and efficacy of sirolimus: relationship to whole-blood concentrations. *Clin Ther* 2000;22 Suppl B:B93-100.
88. Meikle L, Pollizzi K, Egnor A, Kramvis I, Lane H, Sahin M, Kwiatkowski DJ. Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: Effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function
6. *Journal of Neuroscience* 2008;28:5422-5432.
89. Mermoud A, Salmon JF, Murray AD. Trabeculectomy with mitomycin C for refractory glaucoma in blacks. *Am J Ophthalmol* 1993;116:72-78.
90. Mietz H, Addicks K, Diestelhorst M, Krieglstein GK. Intraocular toxicity to ciliary nerves after extraocular application of mitomycin C in rabbits. *Int Ophthalmol* 1995;19:89-93.
91. Mietz H, Welsandt G, Hueber A, Esser C, Krieglstein GK. Synergistic effects of combined cytotoxic and apoptosis-inducing drugs on Tenon's capsule fibroblasts in vitro and in vivo. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1367-1375.
92. Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. Drosophila S6 kinase: A regulator of cell size
2. *Science* 1999;285:2126-2129.
93. Morice MC, Colombo A, Meier B, Serruys P, Tamburino C, Guagliumi G, Sousa E, Stoll HP. Sirolimus- vs paclitaxel-eluting stents in de novo coronary artery lesions: the REALITY trial: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295:895-904.
94. Napoli KL, Kahan BD. Sample clean-up and high-performance liquid chromatographic techniques for measurement of whole blood rapamycin concentrations. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;654:111-120.
95. Napoli KL, Kahan BD. Sample clean-up and high-performance liquid chromatographic techniques for measurement of whole blood rapamycin concentrations. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;654:111-120.
96. Napoli KL, Taylor PJ. From beach to bedside: history of the development of sirolimus. *Ther Drug Monit* 2001;23:559-586.

97. Napolioni V, Moavero R, Curatolo P. Recent advances in neurobiology of Tuberous Sclerosis Complex
6. *Brain & Development* 2009;31:104-113.
98. Olsen TW, Benegas NM, Joplin AC, Evangelista T, Mindrup EA, Holland EJ. Rapamycin inhibits corneal allograft rejection and neovascularization
1. *Arch Ophthalmol* 1994;112:1471-1475.
99. Oza AM, Elit L, Biagi J, Chapman W, Tsao M, Hedley D, Hansen C, Dancey J, Eisenhauer E. Molecular correlates associated with a phase II study of temsirolimus (CCI-779) in patients with metastatic or recurrent endometrial cancer - NCICIND 160
2. *Journal of Clinical Oncology* 2006;24:121S.
100. Oza AM, Elit L, Biagi J, Panasci L, Tonkin K, Tsao M, Dore N, Dancey J, Eisenhauer E, Seymour L. A Phase II study of Temsirolimus (CCI-779) in patients with metastatic and/or recurrent endometrial cancer - NCICCTG IND 160
1. *Ejc Supplements* 2005;3:261.
101. Palmer SS. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy.
Ophthalmology 1991;98:317-321.
102. Pasquale LR, Thibault D, Dormanpease ME, Quigley HA, Jampel HD. Effect of Topical Mitomycin-C on Glaucoma Filtration Surgery in Monkeys.
Ophthalmology 1992;99:14-18.
103. Patitsas CJ, Rockwood EJ, Meisler DM, Lowder CY. Glaucoma filtering surgery with postoperative 5-fluorouracil in patients with intraocular inflammatory disease. *Ophthalmology* 1992;99:594-599.
104. Patingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005;122:927-939.
105. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration
2. *J Clin Invest* 1996;98:2277-2283.
106. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration
2. *J Clin Invest* 1996;98:2277-2283.
107. Poulalhon N, Farge D, Roos N, Tacheau C, Neuzillet C, Michel L, Mauviel A, Verrecchia F. Modulation of collagen and MMP-1 gene expression in fibroblasts by the immunosuppressive drug rapamycin - A direct role as an antifibrotic agent? *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:33045-33052.
108. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide
5. *Br J Ophthalmol* 1996;80:389-393.

109. Quigley HA, Addicks EM, Green WR. Optic nerve damage in human glaucoma. III. Quantitative correlation of nerve fiber loss and visual field defect in glaucoma, ischemic neuropathy, papilledema, and toxic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1982;100:135-146.
110. Quigley HA, Green WR. The histology of human glaucoma cupping and optic nerve damage: clinicopathologic correlation in 21 eyes. *Ophthalmology* 1979;86:1803-1830.
111. Ravikumar B, Sarkar S, Rubinsztein DC. Clearance of mutant aggregate-prone proteins by autophagy
4. *Methods Mol Biol* 2008;445:195-211.
112. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease
16. *Nat Genet* 2004;36:585-595.
113. Rockwood EJ, Parrish RK, Heuer DK, Skuta GL, Hodapp E, Palmberg PF, Gressel MG, Feuer W. Glaucoma filtering surgery with 5-fluorouracil. *Ophthalmology* 1987;94:1071-1078.
114. Roos S, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin
1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C142-C150.
115. Roque M, Reis ED, Cordon-Cardo C, Taubman MB, Fallon JT, Fuster V, Badimon JJ. Effect of p27 deficiency and rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model. *Lab Invest* 2001;81:895-903.
116. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:304-312.
117. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:304-312.
118. Rubinsztein DC, Ravikumar B, Cevedo-Arozena A, Imarisio S, O'Kane CJ, Brown SD. Dyneins, autophagy, aggregation and neurodegeneration
8. *Autophagy* 2005;1:177-178.
119. Sartelet H, Toupance O, Lorenzato M, Fadel F, Noel LH, Lagonotte E, Birembaut P, Chanard J, Rieu P. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy is associated with decreased expression of vascular endothelial growth factor in kidneys
1. *Am J Transplant* 2005;5:2441-2447.
120. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int* 2001;59:3-16.

121. Schaffer M, Schier R, Napirei M, Michalski S, Traska T, Viebahn R. Sirolimus impairs wound healing
1. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:297-303.
122. Schaffer M, Schier R, Napirei M, Michalski S, Traska T, Viebahn R. Sirolimus impairs wound healing
1. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:297-303.
123. Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS, Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function
2. *J Immunol* 1997;158:2375-2381.
124. Schraermeyer U, Diestelhorst M, Bieker A, Theisohn M, Mietz H, Ustundag C, Joseph G, Krieglstein GK. Morphologic proof of the toxicity of mitomycin C on the ciliary body in relation to different application methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:593-600.
125. Schraermeyer U, Diestelhorst M, Bieker A, Theisohn M, Mietz H, Ustundag C, Joseph G, Krieglstein GK. Morphologic proof of the toxicity of mitomycin C on the ciliary body in relation to different application methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:593-600.
126. Schraermeyer U, Diestelhorst M, Bieker A, Theisohn M, Mietz H, Ustundag C, Joseph G, Krieglstein GK. Morphologic proof of the toxicity of mitomycin C on the ciliary body in relation to different application methods. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:593-600.
127. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S-14S.
128. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S-14S.
129. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* 2003;35:7S-14S.
130. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3339-3344.
131. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3339-3344.
132. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3339-3344.

133. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3339-3344.
134. Shi W, Gao H, Xie L, Wang S. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high-risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3339-3344.
135. Shields MB, Scroggs MW, Sloop CM, Simmons RB. Clinical and histopathologic observations concerning hypotony after trabeculectomy with adjunctive mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 1993;116:673-683.
136. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase
4. *Embo Journal* 1998;17:6649-6659.
137. Skuta GL, Parrish RK. Wound-Healing in Glaucoma Filtering Surgery. *Survey of Ophthalmology* 1987;32:149-170.
138. Sousa JE, Sousa AG, Costa MA, Abizaid AC, Feres F. Use of rapamycin-impregnated stents in coronary arteries. *Transplant Proc* 2003;35:165S-170S.
139. Starita RJ, Fellman RL, Spaeth GL, Poryzees EM, Greenidge KC, Traverso CE. Short-Term and Long-Term Effects of Postoperative Corticosteroids on Trabeculectomy. *Ophthalmology* 1985;92:938-946.
140. Sugar HS. Experimental Trabeculectomy in Glaucoma
9. *American Journal of Ophthalmology* 1961;51:623-&.
141. Sugar HS. Clinical Effect of Corticosteroids on Conjunctival Filtering Blebs - A Case Report. *American Journal of Ophthalmology* 1965;59:854-&.
142. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration
1. *Circulation* 2001;103:2967-2972.
143. Tahery MM, Lee DA. Pharmacologic Control of Wound-Healing in Glaucoma Filtration Surgery - Review. *Journal of Ocular Pharmacology* 1989;5:155-179.
144. Teng CC, Chi HH, Katzin HM. Histology and Mechanism of Filtering Operations. *American Journal of Ophthalmology* 1959;47:16-34.
145. Trepanier DJ, Gallant H, Legatt DF, Yatscoff RW. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics and therapeutic range investigations: an update. *Clin Biochem* 1998;31:345-351.

146. Van Buskirk EM. Five-year follow-up of the Fluorouracil Filtering Surgery Study. *Am J Ophthalmol* 1996;122:751-752.
147. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 1975;28:721-726.
148. Wilson MR, Lee DA, Baker RS, Goodwin LT, Wooten F. The Effects of Topical Mitomycin on Glaucoma Filtration Surgery in Rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology* 1991;7:1-8.
149. Windecker S, Remondino A, Eberli FR, Juni P, Raber L, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Tuller D, Seiler C, Roffi M, Corti R, Sutsch G, Maier W, Luscher T, Hess OM, Egger M, Meier B. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2005;353:653-662.
150. Xu Y, Yang GH, Gin WM, Chen KQ, Song XH. Effect of Subconjunctival Daunorubicin on Glaucoma Surgery in Rabbits. *Ophthalmic Surgery and Lasers* 1993;24:382-388.
151. Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J. Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations. *Ther Drug Monit* 1995;17:666-671.
152. Zimmerman JJ, Kahan BD. Pharmacokinetics of sirolimus in stable renal transplant patients after multiple oral dose administration. *J Clin Pharmacol* 1997;37:405-415.

7 Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Manuel Hermann, Benedikt Schröter, Michael Diestelhorst: Wirkung von Rapamycin auf die Vernarbung nach Glaukomchirurgie im Kaninchenmodell

Posterpreis der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, 107. DOG-Kongress 2009, Leipzig

M.M. Hermann, B. Schröter, M. Diestelhorst: Effect of Rapamycin on Postoperative Fibrosis after Filtration Surgery in a Rabbit Model. Poster ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida, USA

8 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name	Dr. med. Benedikt Markus Schröter
Geburtsdatum	12. Dezember 1978
Geburtsort	Warstein
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Nationalität	deutsch
Ehefrau	Dr. med. Sandra Schröter, geb. Seger, Assistenzärztin
Eltern	Dr. med. Michael Schröter, Facharzt für Orthopädie Gisela Schröter geb. Fox, Lehrerin, gest. 20.08.2003

Ausbildung

01/2013	Fachzahnarzt für Oralchirurgie
seit 01/2010	Assistenzarzt in der Klinik für Mund-, Kiefer-, und plastische Gesichtschirurgie an der Universitätsklinik Köln
10/2009	Promotion zum Dr. med. (Note: magna cum laude)
02/2007 – 10/2009	Studium der Zahnmedizin an der Universität Bonn Abschluss mit dem Staatsexamen (Gesamtnote: sehr gut)
04/2006 – 02/2007	Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg
06/2004 – 10/2004	Bone Research Group, Universität von Aberdeen, Großbritannien Stipendium der European Calcified Tissue Society (ECTS)
04/2002 – 04/2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg Abschluss mit dem Staatsexamen (Gesamtnote: gut)
10/2001 – 04/2002	Studium der Humanmedizin an Universität Innsbruck, Österreich
10/1999 – 09/2001	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
07/1998 – 08/1999	Zivildienst im Rettungsdienst des Hochsauerlandkreises und in der Klinik für Technische Orthopädie der Universität Münster
08/1989 – 06/1998	Gymnasium der Stadt Meschede, Abschluss mit dem Abitur
08/1985 – 07/1989	St. Emhildis Grundschule in Meschede