

Rho 激酶抑制剂在青光眼治疗中的应用进展

陈文诗, 宋娜, 张雨晴, 杨雪娇, 朱玮, 杨先

引用: 陈文诗, 宋娜, 张雨晴, 等. Rho 激酶抑制剂在青光眼治疗中的应用进展. 国际眼科杂志 2019; 19(8): 1313-1316

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81600726, 81870653); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2016HB53)

作者单位: (266000) 中国山东省青岛市, 青岛大学附属医院眼科
作者简介: 陈文诗, 在读硕士研究生, 研究方向: 小儿眼科及斜弱视、青光眼、眼眶病。

通讯作者: 杨先, 博士, 主任医师, 眼科中心副主任, 病区主任, 硕士研究生导师, 研究方向: 小儿眼科及斜弱视、青光眼、眼眶病。
yangxian_zhao@126.com

收稿日期: 2018-12-29 修回日期: 2019-07-02

摘要

青光眼是以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的不可逆性致盲性眼病, 高血压是其最主要的发病机制, 而导致高血压的主要原因是房水传统流出途径中小梁网的病理学改变导致的房水流出阻力增加。Rho 激酶抑制剂 (ROCKi) 是直接作用于小梁网 (TM) 的降眼压药物, 主要通过影响细胞骨架改变 TM 细胞形态、细胞运动、胞质分裂和平滑肌收缩等, 从而增加房水流出、降低眼压, 在美国和日本已被批准用于临床; 具有改善视网膜血管灌注、促进视神经再生等作用, 可能存在视神经保护作用; 此外, 具有减少滤过泡瘢痕化等作用。因此, ROCKi 作为新型抗青光眼药物备受关注, 本文将针对 Rho/Rho 激酶信号通路、ROCKi 的作用机制及其临床应用展开综述。

关键词: 青光眼; Rho 激酶抑制剂; 小梁网; 治疗

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.8.11

Progress of Rho-associated protein kinase inhibitor in the treatment of glaucoma

Wen-Shi Chen, Na Song, Yu-Qing Zhang, Xue-Jiao Yang, Wei Zhu, Xian Yang

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81600726, 81870653); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2016HB53)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China

Correspondence to: Xian Yang, Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China. yangxian_zhao@126.com

Received: 2018-12-19 Accepted: 2019-07-02

Abstract

• Glaucoma is a leading cause of irreversible blindness, which is characterized by characteristic optic atrophy and

visual field defects. Elevated intraocular pressure (IOP) is a primary risk factor of glaucoma, while the main cause of elevated IOP lies in the increased aqueous outflow resistance in pathological trabecular meshwork (TM), which is the conventional outflow pathway of aqueous humor. Rho-associated protein kinase inhibitor (ROCKi) is the IOP-lowering drug that is directly acting on the TM. The TM cell morphology, cell movement, cytokinesis and cell contraction by alteration of cytoskeleton can be changed by ROCKi to increase aqueous humor outflow facility and decrease IOP. ROCKi is now approved for clinical use in the United States and Japan. Meanwhile, it might play a role in optic nerve protection through increasing retinal vascular perfusion and promoting optic nerve regeneration. In addition, it decreases the possibility of filtration bleb scarring. Therefore, ROCKi has become a new pharmacological option to treat glaucoma. This article reviews the Rho-Rho kinase signaling pathway, the mechanism of ROCKi and its clinical application.

• KEYWORDS: glaucoma; Rho-associated protein kinase inhibitor; trabecular meshwork; therapy

Citation: Chen WS, Song N, Zhang YQ, et al. Progress of Rho-associated protein kinase inhibitor in the treatment of glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(8): 1313-1316

0 引言

青光眼作为第一大不可逆性致盲性眼病, 是以特征性视神经萎缩和视野缺损为共同特征的疾病^[1]。2010 年全球青光眼患者约 6000 万人, 预计 2020 年将达到 8000 万人, 2040 年全球将有 1 亿多青光眼患者, 而中国 2010 年青光眼患者约有 1600 多万人, 预计 2020 年将超过 2000 万人^[2-3]。在各种类型的青光眼中最常见的是开角型青光眼^[3]。高血压是青光眼最主要的致病机制, 导致眼压升高的主要原因是房水传统流出途径中小梁网 (trabecular meshwork, TM) 的病理学改变所致房水外流阻力增加^[4]。研究表明 TM 细胞是房水传统流出途径的主要细胞, 有调节眼压平衡的重要作用, 通过这一途径房水正常流出几乎没有阻力, 但是如果 TM 细胞发生功能障碍, 这一无阻力的房水流出途径便产生了额外的“阻力”, 导致房水外流阻力增加, 这就是大部分青光眼眼压升高的原因^[5]。

目前临床中延缓青光眼进展的最主要方式就是控制眼压, 研究表明眼压降低 20%~40% 可使视野损失的进展延缓一半^[6]。青光眼治疗首选降眼压药物, 其次为激光和手术治疗^[1]。目前最常用的降眼压药物包括拟交感神经药、 β -肾上腺能阻滞剂、肾上腺能受体激动剂、前列腺素衍生物、碳酸酐酶抑制剂、高渗剂等, 分别通过增加房水流出、抑制房水生成、减少眼内容积等途径降低眼压来治疗

青光眼^[7]。但是这些降眼压药物都没有作用于青光眼最根本的致病部位——TM细胞。此外,部分患者无法用药物控制眼压则需激光或手术治疗,然而通过这些有创的方式仍有部分青光眼患者病情进行性加重,最终导致失明。鉴于青光眼致盲的不可逆性、患病人群的庞大及目前治疗方式的局限性,寻找新的青光眼治疗方式迫在眉睫。

近期研究发现 Rho 激酶抑制剂 (Rho-associated protein kinase inhibitor, ROCKi) 主要通过改变 TM 细胞形态、细胞运动、胞质分裂和平滑肌收缩等影响细胞骨架,从而增加房水流出,降低眼压。ROCKi 作为直接作用于 TM 细胞的降低眼压的新型药物,在青光眼原发病变部位进行治疗,已于 2014 年在日本被批准进入临床使用^[8-10]。由于 ROCKi 具有增加血管灌注、促进视神经再生等作用,可能对视神经也有保护作用,此外,还具有减少滤过泡瘢痕化等作用^[11]。综上,ROCKi 作为新型降眼压药物有相当的应用前景。本文将针对 Rho/Rho 激酶信号通路、ROCKi 的作用机制及其临床应用展开综述。

1 Rho/Rho 激酶信号通路及其作用

1.1 Rho/Rho 激酶信号通路 Rho 蛋白是由 Rho 基因编码的信号肽,由 200~300 个氨基酸组成,相对分子质量为 20~30kDa。在细胞信号传导中,Rho 蛋白起着开关作用,当 Rho 蛋白与 GDP 结合,使 Rho 蛋白激活。Rho 激酶 (Rho-associated protein kinase inhibitor, ROCK) 为 Ras 超家族之一的 Rho 亚组,是一组分子量约为 160kDa 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,而激活的 Rho 蛋白与 ROCK 结合使之活化,活化的 ROCK 可使下游的细胞内底物磷酸化。最具代表性的底物包括肌球蛋白轻链 (myosin light chain, MLC)、肌球蛋白磷酸酶底物 1 (myosin phosphatase substrate 1, MYPT1)、LIM 激酶、CP1-17、钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 和 ERM 蛋白质。肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 可以直接使 MLC 磷酸化,调节平滑肌的收缩,而激活的 ROCK 是 MLCK 活化的关键调控途径,并且近期研究表明 ROCK 可以独立调节 Ca²⁺ 的血管平滑肌收缩和细胞与细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的相互作用,来调节房水的外排^[12]。同样,ROCK 的激活可以使 MYPT1 磷酸化,抑制激动蛋白的收缩^[13]。正是由于 ROCK 通过与这些底物相互作用,调节肌球/动蛋白收缩、细胞粘附、细胞僵硬、细胞形态和 ECM 合成,从而调控房水的流出,维持眼压平衡^[14]。

1.2 Rho/Rho 激酶信号通路在青光眼发病机制中的作用

Rho 激酶有两种同工型 ROCK1 (ROKb/P160) 和 ROCK2 (ROKa),具有近 65% 的同源性,并且由位于人体上的两种不同基因编码,分别位于 18 号和 2 号染色体。眼部组织中除晶状体外都同时有 ROCK1 和 ROCK2 的表达,以往研究表明 ROCK1 和 ROCK2 基因敲除的小鼠出现眼压降低的现象,进一步证实 ROCK 的缺失对眼压有降低作用^[15]。在青光眼患者的房水中发现,转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)、溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 等细胞因子的高表达,而 TGF- β 能够显著增加交联肌动蛋白网络 (cross-linked actin networks, CLANs) 的形成,诱导 ECM 蛋白质的合成,并且可以促进 CTGF 的产出,使细胞粘附性增加,增加细胞硬度,增加房水流出阻力^[16]。LPA 可以诱导多种类型的细胞反应,包括 ROCK 调节的细胞粘附、收缩、细胞

增殖、细胞迁移、细胞因子和趋化因子分泌、血小板聚集、平滑肌细胞转化和神经突回缩,可以影响 TM 细胞的收缩和粘附特性,并被认为参与青光眼的发病机制^[17]。此外,通过比较正常眼与青光眼 TM 细胞骨架发现,青光眼的 F-actin 蛋白位于更中心的位置,并且呈无序的形态,细胞骨架的改变是青光眼的一大重要致病机制^[18]。青光眼患者通过促进 Rho/Rho 激酶信号通路传导途径,使下游 MYPT1、MLC、LIMK 等细胞因子增多,肌球/动蛋白平衡改变,增加 ECM 蛋白质的合成,改变了细胞骨架,使细胞粘附性增加,最终导致房水流出减少,眼压升高^[11]。基于 ROCK 在肌动蛋白管理的重要作用,所以 ROCKi 作为促进 TM 细胞房水流出的降眼压药物,也是直接作用于青光眼病变原发部位的药物而备受瞩目^[19]。

2 ROCKi 的降眼压作用

2.1 不同 ROCKi 的降眼压作用机制 目前研究发现不同种类的 ROCKi,包括 Y-27632、Y-39983、HA-1077、H-1152、K-115 等均有改变 TM 细胞收缩的作用,一定程度增加房水流出,降低眼压。但是其作用浓度、降眼压的幅度、作用机制有一定的差异,如 Y-39983 局部给药降眼压作用比 Y-27632 明显,HA-1077 对 ROCK 的特异性较 Y-27632 弱^[20-22]。其中 Y-27632 为最近发现的一种 Rho 激酶抑制剂,也是最常用于研究改善房水流出功能机制的 ROCKi,对 ROCK1 和 ROCK2 的选择性抑制几乎没有差异^[14, 23]。其在不同物种有一定的降低眼压作用,下文将以 Y-27632 作为 ROCKi 代表详细讲述其降眼压的机制。在体外实验中,通过 Y-27632 处理的人 TM 细胞在显微镜下观察出现了细胞收缩、变圆的形态学变化,并且在免疫荧光显微镜下观察到通过 Y-27632 处理的细胞大部分肌动蛋白束消失、粘着斑的减少等细胞骨架的改变,并且明显抑制了 TGF- β 诱导 CLANs 的形成,定量 PCR 发现 Y-27632 处理过的细胞明显比地塞米松处理过的细胞纤维连接蛋白、ECM 蛋白的表达低,Western 免疫印记可以看出经过 Y-27632 使细胞纤维连接蛋白,胶原蛋白 1A 和波形蛋白的表达显着降低,并且 Y-27632 可以诱导肌球蛋白轻链的去磷酸化,而 MLC 磷酸化状态是 Rho//Rho 激酶信号通路调节细胞和松弛的重要因素^[16, 24-25]。凝血酶增加细胞硬度高达 200%,而同时加入 Y-27632 可使细胞硬度减低到 40%~80%;凝血酶可使细胞电阻增加到 160%,而 Y-27632 将细胞电阻降低至 60% 左右,并导致细胞与细胞的分离^[26]。这些都表明 Y-27632 通过对细胞骨架和 ECM 的影响,从而改善房水流出功能,起到降眼压作用。另外,以往研究表明一氧化氮 (nitric oxide, NO) 对 TM 细胞有放松作用,增加房水流出量,并且青光病患者眼中 NO 和 NOS 的表达水平降低,ROCKi 对 eNOS mRNA 和 NO 产生的促进作用,这也可能与其降眼压作用有关^[27]。除了目前较常使用的 ROCKi,最近又新发现了一种新型 ROCKi—SB772077B,在和 Y-27632 相同浓度处理细胞显示出更明显的细胞收缩,肌蛋白束和黏着斑的减少。这种新型 ROCKi 对 ROCK1 的选择性比 ROCK2 更高^[28]。

2.2 Y-27632 在不同物种中的降眼压作用 1997 年首次通过局部给药、前房注射、玻璃体注射 Y-27632 分别测量兔眼的眼压和房水流畅系数、瞳孔直径,结果发现 Y-27632 有明显增加房水流出、增大瞳孔直径和降眼压的

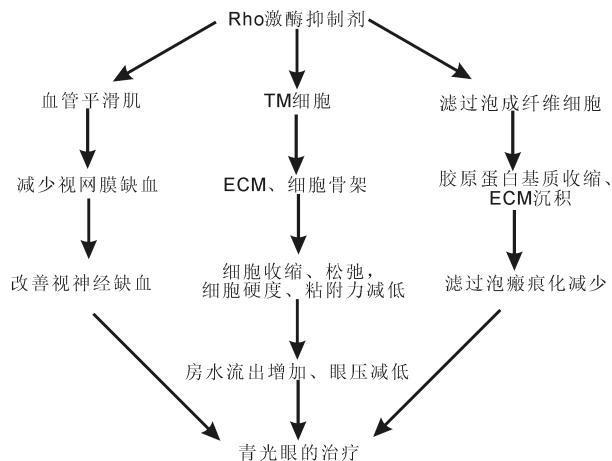


图1 Rho 激酶抑制剂在青光眼治疗中的作用模式图。

作用^[29]。之后 Y-27632 作为最常用的 ROCKi 在不同物种实验中被广泛用于 ROCKi 的降眼压机制研究。在体内实验中, Y-27632 在小鼠、兔、猪、猴、人身上都有显著增加房水流出,降低眼压的作用^[15]。在猪眼、猴眼和人眼灌注模型中,灌注不同压力的 Y-27632 都呈现出近管小梁组织(juxtacanalicular TM, JCT)增厚,与房水流畅系数显著增大的结果成正相关^[23]。但是由于灌注系统的不同,达到显著差异的时间和灌注量不同种类也不相同,无法进行种群的比较^[24, 30-31]。但是可以明显看出 Y-27632 有改善房水外流的作用(图1)。

3 ROCKi 在青光眼领域中的临床应用

3.1 ROCKi 的降眼压应用 基于以上体内外实验的研究,一些医药公司开始探索 ROCKi 在人体中降眼压的影响,相继研发新药物,在评估人体临床安全性和有效性后,目前研发出的药物包括 Ripasudil (K-115)、Fasudil (HA-1077)、SNJ-1656、AMA0076、AR-12286 和 Netarsudil (AR-13324)等,其中 Fasudil 为虽然被批准运用于临床,但是还未用于青光眼的治疗^[32], Ripasudil (Kowa) 和 Netarsudil (Aerie), 分别在日本和美国成功进入 III 期临床试验阶段。在 III 期临床试验中,每日两次局部给予 0.4% ripasudil 平均减少青光眼患者昼夜眼压 2.9mmHg。Ripasudil 最近在日本获得批准用于治疗高眼压和青光眼,并且这种药物与 β 受体阻滞剂噻吗洛尔联用时可以增强疗效,这也预示作为与其他降眼压药物有不同降眼压机制的 ROCKi 可与其他类型降眼压药物联用,增大降眼压的效果。在 Ripasudil III 期临床试验中发现,轻度结膜充血为最常见的不良反应,发生率高达 75%。此外,结膜炎、点状角膜炎等也有发生^[8, 14]。Netarsudil 为 ROCK/去甲肾上腺素转运蛋白(norepinephrine transporter, NET)抑制剂化合物,除了作为 ROCK 抑制剂的作用外,还有抑制去甲肾上腺素的作用,具有持续降眼压的作用,并且局部耐受性好,仅有轻度的结膜充血反应^[33]。针对现有 ROCKi 药物的不良反应,目前改进的手段包括使用 ROCK2 特异性抑制药物 KD025 和短效的温和型 ROCKi。不过目前看来,经过 3a 的临床应用,目前还没有发生较严重的不良事件^[34]。因此,ROCKi 这一直接作用于 TM 细胞的可以显著降眼压的新型药物是值得期待的。

3.2 ROCKi 的其他眼部效应 有研究表明,ROCKi 除了作用于 TM 细胞而降低眼压外,对眼部其他部位的作用也可能有额外的效果,如延缓青光眼的进展、降低青光眼术后

滤过道瘢痕化等。青光眼性视神经损伤的机制之一是血管缺血,导致视神经供血不足。最近,在小鼠动物模型中发现 Ripasudil 可以减轻视网膜水肿、减少缺血灌注区、改善视网膜静脉的灌注^[10]。因此,ROCKi 对于减缓青光眼的进展,不仅是由于降低眼压,还可能通过改善视神经缺血而发挥作用。此外,有研究报道称 ROCKi 对小鼠的视神经具有保护作用,可促进视神经轴突的再生,但在人体上是否也有同样的效果仍需进一步试验,如果在人身上有同样作用,那么 ROCKi 不仅在 TM 细胞上有着降眼压的作用,并且对于视神经也可能具有保护作用。另外,目前青光眼滤过手术失败的主要原因就是滤过泡和 ECM 沉积物瘢痕化,成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞是伤口愈合和瘢痕形成的关键步骤,与 ECM 蛋白、生长因子和整合素的表达增强有关,最近研究表明 ROCKi 可通过抑制成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞来减少瘢痕,主要是通过抑制 TGF- β 信号传导和 LPA 诱导的纤维化反应减少胶原蛋白基质收缩和 ECM 沉积^[11](图1)。

4 展望

综合前期的基础研究、临床试验及近 3a 的临床应用,ROCKi 作为直接作用于 TM 细胞的新型降眼压药物的效果是值得肯定的。如果今后进一步研究发现 ROCKi 在人体上也有增加血液灌注,促进视神经再生的作用,那么 ROCKi 对于青光眼患者治疗中的应用价值可能会进一步提升。但是,目前对于 ROCKi 的认识还不够充分,其降眼压的机制尚未有完全的认识,需要进一步的研究。

参考文献

- Jonas JB, Aung T, Bourne RR, et al. Glaucoma. *Lancet* 2017; 390(10108): 2183-2193
- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(3): 262-267
- Tham YC, Li X, Wong TY, et al. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 2014; 121(11): 2081-2090
- Stamer WD, Braakman ST, Zhou EH, et al. Biomechanics of Schlemm's canal endothelium and intraocular pressure reduction. *Prog Retin Eye Res* 2015; 44: 86-98
- Stamer WD, Clark AF. The many faces of the trabecular meshwork cell. *Exp Eye Res* 2017; 158: 112-123
- Quigley HA. Glaucoma. *Lancet* 2011; 377(9774): 1367-1377
- Dikopf MS, Vajaranant TS, Edward DP. Topical treatment of glaucoma: established and emerging pharmacology. *Expert Opin Pharmacother* 2017; 18(9): 885-898
- Garnock-Jones KP. Ripasudil: first global approval. *Drugs* 2014; 74(18): 2211-2215
- Lutjen-Drecoll E, Gabelt BT, Tian B, et al. Outflow of aqueous humor. *J Glaucoma* 2001; 10(5 Suppl 1): S42-44
- Hida Y, Nakamura S, Nishinaka A, et al. Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model. *J Pharmacol Sci* 2018; 137(2): 129-136
- Honjo M, Tanihara H. Impact of the clinical use of ROCK inhibitor on the pathogenesis and treatment of glaucoma. *Jap J Ophthalmol* 2018; 62(2): 109-126
- Rao PV, Deng P, Sasaki Y, et al. Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humour outflow facility. *Exp Eye Res* 2005; 80(2): 197-206
- Ramachandran C, Patil RV, Sharif NA, et al. Effect of elevated intracellular cAMP levels on actomyosin contraction in bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(3): 1474-1485

- 14 Rao PV, Pattabiraman PP, Kopczynski C. Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma: Bench to bedside research. *Exp Eye Res* 2017; 158: 23-32
- 15 Whitlock NA, Harrison B, Mixon T, et al. Decreased intraocular pressure in mice following either pharmacological or genetic inhibition of ROCK. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25(3): 187-194
- 16 Montecchi-Palmer M, Bermudez JY, Webber HC, et al. TGFbeta2 Induces the Formation of Cross-Linked Actin Networks (CLANs) in Human Trabecular Meshwork Cells Through the Smad and Non-Smad Dependent Pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; 58(2): 1288-1295
- 17 Honjo M, Igarashi N, Nishida J, et al. Role of the Autotaxin-LPA Pathway in Dexamethasone-Induced Fibrotic Responses and Extracellular Matrix Production in Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(1): 21-30
- 18 Inoue T, Tanihara H. Rho-associated kinase inhibitors: a novel glaucoma therapy. *Prog Retin Eye Res* 2013; 37: 1-12
- 19 Ramachandran C, Patil RV, Combrink K, et al. Rho-Rho kinase pathway in the actomyosin contraction and cell-matrix adhesion in immortalized human trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 2011; 17: 1877-1890
- 20 Honjo M, Inatani M, Kido N, et al. Effects of protein kinase inhibitor, HA1077, on intraocular pressure and outflow facility in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol* 2001; 119(8): 1171-1178
- 21 Tokushige H, Inatani M, Nemoto S, et al. Effects of topical administration of γ -39983, a selective rho-associated protein kinase inhibitor, on ocular tissues in rabbits and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48(7): 3216-3222
- 22 Nishio M, Fukunaga T, Sugimoto M, et al. The effect of the H-1152P, a potent Rho-associated coiled coil-formed protein kinase inhibitor, in rabbit normal and ocular hypertensive eyes. *Curr Eye Res* 2009; 34(4): 282-286
- 23 Gong H, Yang CY. Morphological and hydrodynamic correlations with increasing outflow facility by rho-kinase inhibitor Y-27632. *J Ocul Pharmacol Ther* 2014; 30(2-3): 143-153
- 24 Rao PV, Deng PF, Kumar J, et al. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(5): 1029-1037
- 25 Fujimoto T, Inoue T, Kameda T, et al. Involvement of RhoA/Rho-associated kinase signal transduction pathway in dexamethasone-induced alterations in aqueous outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(11): 7097-7108
- 26 Wang JW, Woodward DF, Stamer WD. Differential effects of prostaglandin E2-sensitive receptors on contractility of human ocular cells that regulate conventional outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(7): 4782-4790
- 27 Kim JW. Comparative Study of the Effects of Trabecular Meshwork Outflow Drugs on the Permeability and Nitric Oxide Production in Trabecular Meshwork Cells. *Korean J Ophthalmol* 2017; 31(5): 452-459
- 28 Ashwinbalaji S, Senthilkumari S, Gowripriya C, et al. SB772077B, A New Rho Kinase Inhibitor Enhances Aqueous Humour Outflow Facility in Human Eyes. *Sci Rep* 2018; 8(1): 15472
- 29 Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(1): 137-144
- 30 Kameda T, Inoue T, Inatani M, et al. The effect of Rho-associated protein kinase inhibitor on monkey Schlemm's canal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(6): 3092-3103
- 31 Yang CY, Liu Y, Lu Z, et al. Effects of Y27632 on aqueous humor outflow facility with changes in hydrodynamic pattern and morphology in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(8): 5859-5870
- 32 Saito A, Inoue M, Kon H, et al. Effectiveness of intraarterial administration of fasudil hydrochloride for preventing symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2015; 120: 297-301
- 33 Lin CW, Sherman B, Moore LA, et al. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther* 2018; 34(1-2): 40-51
- 34 Defert O, Boland S. Rho kinase inhibitors: a patent review (2014-2016). *Expert Opin Ther Pat* 2017; 27(4): 507-515