

Liposomit silmälääkkeiden kantaja-aineina

Liposomes as carriers for ophthalmic drugs

Milla Hämäläinen  
Pro gradu -tutkielma  
Proviisorin koulutusohjelma  
Itä-Suomen yliopiston  
Farmasian laitos  
Toukokuu 2012

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Farmasian laitos

Proviisorin koulutusohjelma

Farmasian teknologia

HÄMÄLÄINEN MILLA, B.: Liposomit silmälääkkeiden kantaja-aineina. Liposomes as carriers for ophthalmic drugs.

Opinnäytetutkielma, 92 s.

Opinnäytetutkielman ohjaajat:

professori Kristiina Järvinen, tutkija Tuomas Paimela ja professori Kai Kaarniranta

Toukokuu 2012

---

Avainsanat: Liposomit, silmäimeytyminen, stilbeenit, silmänpohjan ikärappeuma,

Lääkeaineiden silmäimeytyminen on edelleen suurimpia haasteita farmaseuttisessa tutkimuksessa. Silmälääkinnän merkittävimpänä ongelmana on perinteisten silmävalmisteiden alhainen hyötyosuus silmässä. Syynä tähän ovat silmän erilaiset anatomiset sekä patofysiologiset esteet, joiden vuoksi silmä läpäisee huonosti vierasaineita. Viimeisen vuosikymmenen ajan on tutkittu useita erilaisia lääkeaineen kantajasysteemejä, joiden avulla voitaisiin ratkaista perinteisten silmälääkeformulaatioiden puutteet. Liposomit ovat olleet eräänä tutkituista kantajasysteemeistä.

Liposomiformulaatioiden on osoitettu useissa tutkimuksissa mahdollistavan kontrolloidun ja jatkuvan lääkeaineen kuljetuksen silmän etu- ja sisäosiin. Liposomit ovat biologisesti yhteensopivia ja biohajoavia nanokantajia, jotka voivat kapseloida sisäänsä sekä hydrofiilisiä että -fobisia lääkeaineita. Liposomien pintavarausta, partikkelikokoa ja koostumusta muuntelemalla niitä voidaan myös muokata tarkoitukseen sopivaksi. Tämän monimuotoisen luonteensa vuoksi liposomeja on tutkittu sekä silmän etuosan että takaosan sairauksien hoidossa. Silmän etuosassa liposomien on havaittu lisäävän lääkeaineen silmäimeytymistä pidentämällä lääkeaineen vaikutusaikaa sekä lisäämällä lääkeaineen sarveiskalvoläpäisevyyttä. Silmän takaosassa liposomit pidentävät lääkeaineen puoliintumisaikaa sekä lisäävät verkkokalvolle kohdennettua lääkeaineen kuljetusta. Liposomien ainutkertaisista hyödyistä huolimatta liposomien käyttöä silmälääkinnässä kuitenkin rajoittavat stabiilisuus- ja steriilisyysongelmat sekä valmistukseen liittyvät ongelmat.

Kokeellisen osan tarkoituksena oli tutkia stilbeenien, trans-resveratrolin ja pinosylviinin, mahdollisia suojaavia vaikutuksia hydrokinonilla indusoitua oksidatiivista stressiä vastaan ARPE-soluissa. Tutkimuksen taustalla on silmänpohjan ikärappeuma, jonka synnyssä oksidatiivisella stressillä on merkittävä rooli. Viime aikoina useat tutkimukset ovat osoittaneet, että stilbeenit voivat mahdollisesti viivästyttää ja ehkäistä silmänpohjanikärappeuman kehittymistä. Stilbeenien suojaavia vaikutuksia tutkittiin *in vitro* MTT- ja LDH-testien avulla.

Tulokset olivat eriäväisiä eri sytotoksisuuskokeiden välillä. MTT-testin tulokset osoittivat stilbeenien omaavan suojaavia vaikutuksia oksidatiivilta vaurioilta, joiden on kirjallisuudessa uskottu johtuvan niiden kyvystä stimuloida BK<sub>Ca</sub>-kanavia. LDH-testin tuloksissa sen sijaan ei havaittu suojaavia vaikutuksia. Aiemminkin toksisuusmittauksissa käytetyllä menetelmällä on raportoitu olevan merkitystä saataviin tuloksiin.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences

School of Pharmacy

Master of Science in Pharmacy program

Pharmaceutical Technology

HÄMÄLÄINEN MILLA, B.: Liposomit silmälääkkeiden kantaja-aineina. Liposomes as carriers for ophthalmic drugs.

Master's thesis, 92 s.

Supervisors:

professor Kristiina Järvinen, researcher Tuomas Paimela and professor Kai Kaarniranta

May 2012

---

Key words: Liposomes, ocular drug delivery, stilbenoids, age-related macular degeneration

Efficient ocular drug delivery remains a major challenge for pharmaceutical research. A major problem in ocular therapeutics is poor bioavailability of conventional ophthalmic formulations. It is due to various anatomical and pathophysiological barriers of the eye, which render this organ exquisitely impervious to xenobiotics. Over the last decade, numerous drug delivery systems have been widely explored to improve the bioavailability of the conventional ophthalmic dosage forms. Liposomes have been one of the explored carrier system.

Liposomes have been showed by many researches to enable the controlled and continuous delivery of drugs to pre- and intraocular tissues. Liposomes offer major advantages as ocular carrier system. Liposomes are biodegradable and biocompatible nanocarrier, which can encapsulate both the hydrophilic and hydrophobic drug molecules. Liposomes have also the potential to be tailored in a variety of ways to ensure the production of formulations that are optimal for use by modification of surface charge, particle size and composition of liposomes. Because of their versatile nature, liposomes have been widely studied for the treatment of both anterior and posterior segment eye disorders. For anterior segment drug delivery, liposomes improve corneal adhesion and permeation. For posterior segment drug delivery, liposomes enhance the intravitreal half-life and enable targeted drug delivery to the retina. Despite all the unique advances of liposomes, the potential use of them is restrained because of problems in stability, sterilization and manufacture.

The purpose of the experimental part was to examine the potential protective effects of trans-resveratrol and pinosylvin on the hydroquinone-induced oxidative stress in ARPE-cells. Oxidative stress has been suggested to play a key role in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). Recently several studies have shown that stilbenoids may delay or prevent the development of the AMD. The protective effects of stilbenoids were studied with MTT and LDH assays.

Results between MTT and LDH tests were divergent. MTT test results showed that trans-resveratrol and pinosylvin exerted a protective effect against the oxidative damage caused by hydroquinone. Other studies have suggested that this is result of silbenoids ability to stimulate BK<sub>Ca</sub>-channels. LDH test results instead didn't show any protective effects of stilbenoids. It has been reported that different cytotoxicity assays may show different results depending on the cytotoxicity assay employed.

## **ESIPUHE**

Tämä pro gradu –tutkielma on tehty Itä-Suomen yliopistossa farmasian teknologian oppiaineelle. Toteutin erikoistyön marras-helmikuussa 2011-2012 silmätautien laboratoriossa Kuopiossa. Suuret kiitokset professori Kristiina Järviselle gradun kirjallisen osan innostuneesta ja asiantuntevasta ohjauksesta sekä tutkija Tuomas Paimelalle ja professori Kai Kaarnirannalle erikoistyön hyvästä ohjauksesta.

Kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni, joiden tuki oli koko graduprosessin aikana korvaamattoman arvokasta.

Kuopiossa toukokuussa 2012

Milla Hämäläinen

# SISÄLTÖ

## TIIVISTELMÄ

## ESIPUHE

## SISÄLTÖ

### I KIRJALLINEN OSA:

#### LIPOSOMIT SILMÄLÄÄKKEIDEN KANTAJA-AINEINA

1 JOHDANTO .....	7
2 LIPOSOMIEN RAKENNE JA OMINAISUUKSIA.....	11
3 LIPOSOMIEN VALMISTUSMENETELMÄT .....	15
3.1 Monikerroksiset liposomit (MLV) .....	16
3.2 Pienet yksikerroksiset liposomit (SUV) .....	16
3.3 Suuret yksikerroksiset liposomit (LUV) .....	17
4 LIPOSOMIEN HYÖDYT SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ .....	18
5 LIPOSOMIEN FYSIKAALIS-KEMIAALLISTEN OMINAISUUKSIEN VAIKUTUS LIPOSOMIFORMULAATION FARMOKOKINETIIKKAAN JA TERAPEUTTISEEN TEHOON SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ.....	21
5.1 Kolesterolipitoisuus .....	21
5.2 Pintavaraus .....	24
5.3 Liposomien valmistusmenetelmät (REV-MLV) .....	29
5.4 Koko.....	30
5.5 Bioadhesiivisten polymeerien käyttö .....	32
6 LIPOSOMIEN KÄYTTÖAIHEITA SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ .....	36
6.1 Silmän etuosan käyttöaiheita .....	36
6.2 Silmän takaosan käyttöaiheita.....	43
7 LIPOSOMIFORMULAATIOIDEN ONGELMIA .....	53
7.1 Stabiilisuus.....	53

7.2 Sterilointi .....	54
7.3 Valmistukseen liittyvät ongelmat .....	55
8 YHTEENVETO .....	58

## **II KOKEELINEN OSA:**

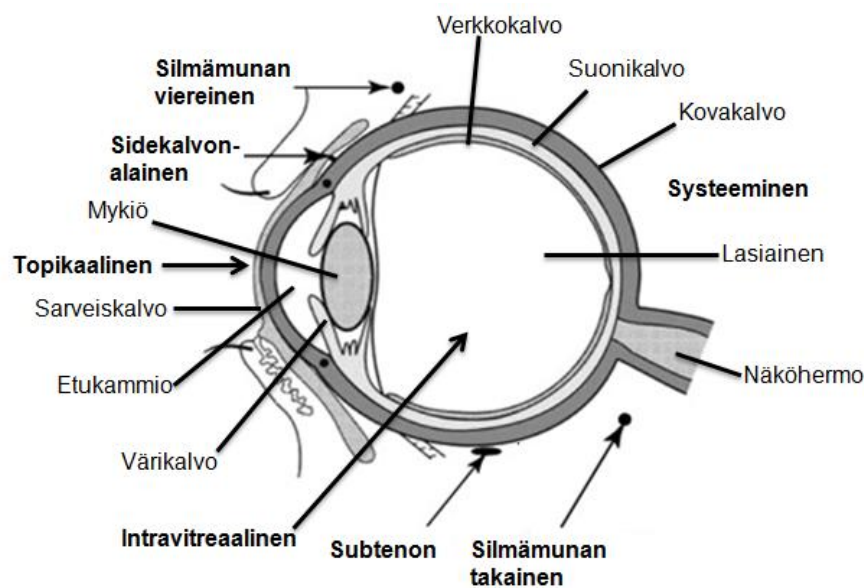
### **TRANS-RESVERATROLIN JA PINOSYLVIIININ SUOJAAVAT VAIKUTUKSET OKSIDATIIVISELLE STRESSILLE HYDROKINONIALTISTUKSESSA ARPE- SOLUISSA**

9 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET .....	61
10 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	67
10.1 Soluviljely .....	67
10.2 LDH-testi .....	67
10.3 MTT-testi.....	69
11 TULOKSET .....	71
11.1 LDH-testin tulokset.....	71
11.2 MTT-testin tulokset.....	73
12 POHDINTA.....	75
13 LÄHTEET .....	77

# 1 JOHDANTO

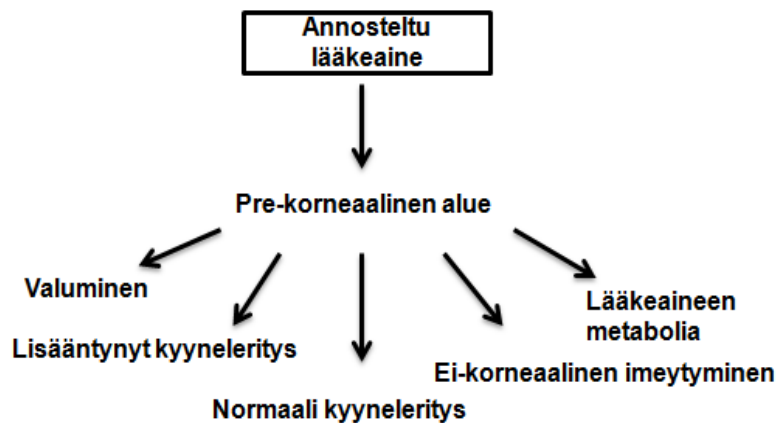
Silmä on pieni, moniosainen ja monimutkainen elin (Wadhwa ym. 2009). Silmän rakenteet toimivat merkittävinä esteinä lääkeaineiden imeytymisessä. Silmän ainutlaatuinen anatomia, fysiologia sekä biokemia tekevät silmän lähes läpäisemättömäksi vierasaineille.

Rakenteellisesti silmä voidaan jakaa etu- ja takaosaan (kuva 1) (Kivelä 2011). Silmän etuosa koostuu sarveiskalvosta, mustuaisesta, kammionesteestä, värikalvosta, mykiöstä sekä sädekehästä. Silmän takaosan rakenteita ovat kova-, suoni- ja verkkokalvo, lasiainen sekä näköhermo. Lääkeaineen kuljettaminen silmän etu- ja takaosaan tapahtuu paikallisella tai systeemisellä annostelulla. Koska silmä on yksi suojatuimmista kudoksista elimistössä, on lääkeaineiden saaminen vaikutuspaikalleen, erityisesti silmän takaosaan, haasteellista (Gaudana ym. 2008). Syynä tähän ovat silmän erilaiset puolustusmekanismit, jotka suojelevat silmää haitallisilta aineilta, varmistavat sen hyvinvoinnin ja häiriöttömän toiminnan sekä samalla vaikeuttavat myös lääkkeiden pääsyn silmään.



**Kuva 1. Silmän rakenne ja silmävalmisteiden yleisimmät annostelutavat (muokattu lähteestä Thrimawithana ym. 2010).**

Merkittävämmät silmän puolustusmekanismeista ovat prekorneaaliset tekijät (kuva 2), sarveis- ja sidekalvo, sekä veri-silmäesteet (Hornof ym. 2005, Urtti 2006). Prekorneaaliset tekijät estävät topikaalisesti annostellun lääkeaineen silmäimeytymistä eliminoimalla lääkeaineen kyynelnesteestä ja lyhentämällä siten lääkeaineen kontaktiaikaa sarveiskalvolla (Järvinen ym. 1995). Silmävalmisteiden topikaalisen annostelun merkittävimpana esteenä toimii sarveiskalvo. Sarveiskalvo muodostuu viidestä eri kerroksesta, joiden erilaisten ominaisuuksien vuoksi sarveiskalvo on tehokas este sekä hydrofiilisten että hydrofobisten aineiden silmäimeytymiselle.



**Kuva 2. Lääkeaineen imeytymistä rajoittavat prekorneaaliset tekijät topikaalisessa annostelussa (muokattu lähteestä Mainardes ym. 2005).**

Veri-silmäesteet rajoittavat lääkeaineiden pääsyä silmään systeemisestä verenkierrosta (Hornof ym. 2005, Urtti 2006). Veri-silmäesteitä on olemassa kaksi: veri-kammioneste-este ja veri-verkkokalvoeste. Silmän etuosassa oleva veri-kammioneste-este on värikanalon endoteelistä sekä sädekehän pigmentoitumattomasta siliaariepiteelistä muodostuva este, joka rajoittaa lääkeaineiden pääsyn plasmasta kammionesteeseen. Veri-verkkokalvoeste sen sijaan estää lääkkeiden pääsyä systeemiverenkierrosta silmän takaosaan, verkkokalvolle ja lasiaiseen. Tämän veri-aivoesteen kaltaisen silmän puolustusmekanismin muodostavat verkkokalvon pigmenttiepiteeli (RPE) ja verkkokalvon kapillaarien endoteelisolut.



Tyypillisimmät silmävalmisteiden antotavat ovat topikaalinen, systeeminen, intravitreaalinen annostelu sekä periokulaariset (sidekalvonalainen, silmämunan viereinen ja takainen sekä subtenon injektiot) annostelutavat (kuva 1). Topikaalinen annostelu on silmävalmisteiden yleisin annostelureitti johtuen sen helppoudesta sekä turvallisuudesta. Topikaalisen annostelun kohteena on tyypillisesti silmän etuosa, sillä riittävien lääkeainepitoisuuksien kuljettaminen silmän etuosasta takaosaan on lähes mahdotonta pitkän diffuusiomatkan sekä lääkeaineiden heikon sarveiskalvoimeytymisen vuoksi (Eljarrat-Binstock ym. 2010). Paikallisesti annostellusta silmätipan annoksesta kuitenkin vain alle 5 % imeytyy silmään, sillä suurin osa lääkeaineesta (50–100%) imeytyy systeemisesti silmän sidekalvon ja nenän limakalvoilta edellä mainittujen prekorneaalisten tekijöiden takia.

Silmävalmisteiden annostelu silmän takaosaan tapahtuu tyypillisesti systeemisesti, intravitreaalisesti tai periokulaarisesti (Gaudana ym. 2010). Koska vain pieni osa lääkeaineista läpäisee veri-silmäesteet, joudutaan systeemisesti annosteltaessa käyttämään suuria lääkeaineannoksia riittävän pitoisuuden saavuttamiseksi silmän takaosassa (Hornof ym. 2005). Suuret lääkeaineannokset voivat aiheuttaa haitallisia sivuvaikutuksia, ja siksi systeeminen annostelu ei ole kovin yleinen antoreitti. Yleisempänä annostelutapa sen sijaan on intravitreaaliset injektiot, joiden avulla vältetään systeemisiltä haittavaikutuksilta sekä saavutetaan korkeat lääkeainepitoisuudet silmän takaosassa. Yleensä lääkeaineiden puoliintumisaika on kuitenkin lasiaisessa lyhyt, joten injektioita joudutaan antamaan tiheästi terapeuttisen lääkeainepitoisuuden ylläpitämiseksi. Toistuvat intravitreaaliset injektiot aiheuttavat kipua ja lisäävät paikallisten haittavaikutuksien, kuten lasiaisverenvuotojen, endoftalmiittin ja verkkokalvon irtoamisen, mahdollisuutta (Jager ym. 2004). Tämän vuoksi olisikin toivottavaa kehittää lääkevalmisteita, joiden avulla pystyttäisiin pidentämään lääkeaineiden puoliintumisaikoja ja minimoimaan siten pistokerrat.

Periokulaarisessa annostelussa intravitreaalisen annostelun ongelmia ei tavata, sillä lääkeaine kuljetetaan silmän takaosaan silmämunan ulkopuolelle annettavilla injektioilla (Thrimawithana ym. 2010). Periokulaariaia annostelutapoja ovat sidekalvonalainen, silmämunan viereinen ja takainen sekä subtenon injektiot. Lääkeaineiden periokulaarinen annostelu on turvallisempaa kuin intravitreaalinen annostelu, sillä silmämunaa ei tarvitse lävistää. Sen haittana on kuitenkin

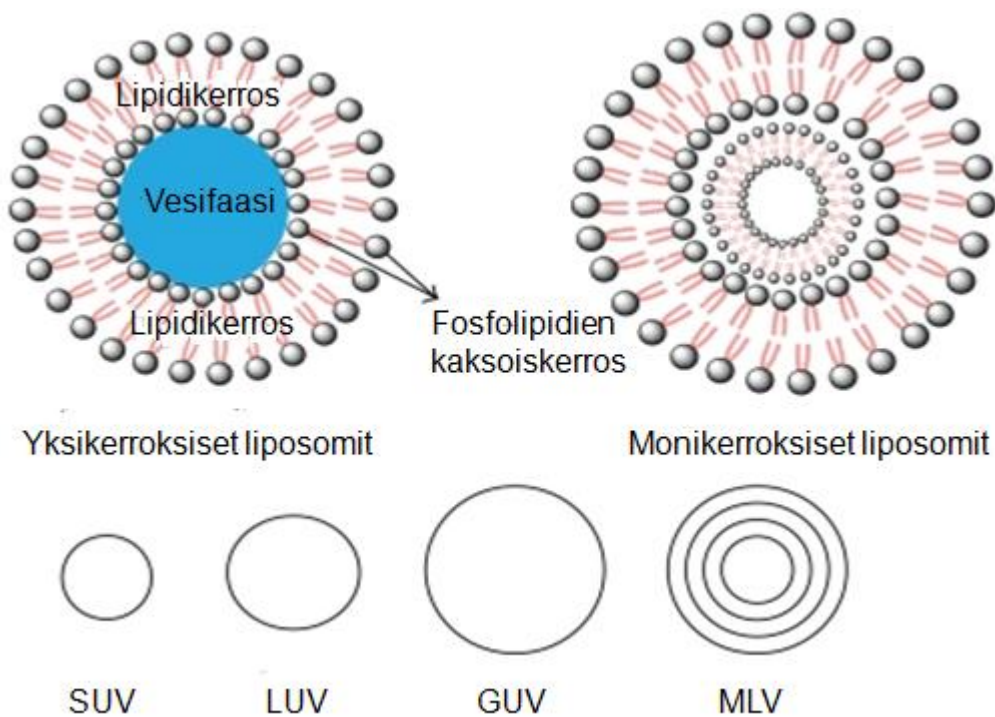
lääkeaineen kulkeutuminen systeemisen verenkiertoon, mikä voi aiheuttaa systeemisiä haittavaikutuksia.

Perinteiset silmäformulaatiot, kuten liuokset ja suspensiot, omaavat huonon biologisen hyötyosuuden silmän ainutkertaisten anatomisten ja fysiologisten esteiden takia (Mishra ym. 2010). Viimeisten vuosikymmenien ajan onkin tutkittu useita erilaisia lääkeaineiden kuljetussysteemejä, jotka ratkaisisivat perinteisiin silmäformulaatioihin liittyvät ongelmat (Kaur ja Kanwar 2002, Wadhwa 2009). Liposomeja on tutkittu useiden vuosikymmenien ajan lääkeaineen kantajasysteeminä (Mishra ym. 2010). Ne ovat osoittautuneet ainutlaatuisten ominaisuuksien vuoksi tehokkaaksi keinoksi parantaa sekä silmän etuosaan että takaosaan annosteltavien lääkeaineiden hyötyosuutta sekä tehokkuutta.

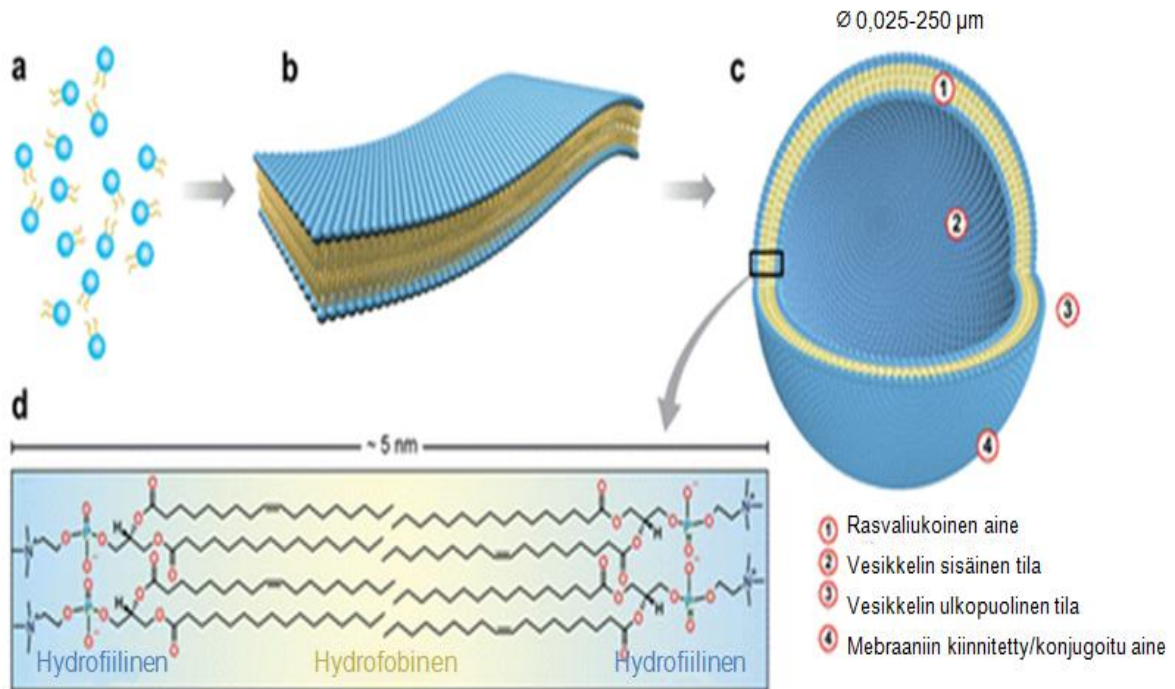
Tämän pro gradu –tutkielman kirjallinen osa käsittelee liposomeja sekä niiden käyttöä nanokantajana silmälääkinnässä. Katsauksessa perehdytään liposomien erityispiirteisiin sekä liposomien tarjoamiin hyötyihin silmälääkinnässä. Kirjallisuuskatsauksessa on pyritty kokomaan liposomien fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien vaikutukset niiden toimintaan nanokantajina silmässä. Lisäksi tutkielmassa perehdytään liposomien käyttökohteisiin silmässä viimeisen vuosikymmenen ajalta.

## 2 LIPOSOMIEN RAKENNE JA OMINAISUUKSIA

Liposomit ovat mikroskooppisen pieniä (10 nm - 1 µm), fosfolipidien kaksoiskerrosten muodostamia pallomaisia vesikkeleitä, jotka ovat sulkeneet sisäänsä vesitilan (kuva 3) (Bochet ym. 2000). Liposomit muodostuvat fosfolipidien spontaanin järjestäytymisen tuloksena vesipitoisessa ympäristössä. Yksikerroksisen liposomin muodostuminen on kuvattu kaavamaisesti kuvassa 4.



**Kuva 3. Eri liposomityyppien rakenteet (muokattu lähteestä Mishra ym. 2011). Lyhenteet on selitetty taulukossa 1.**



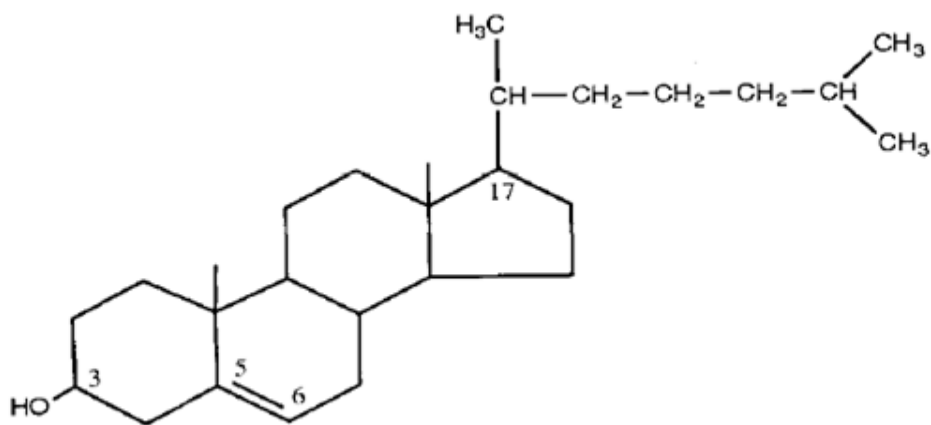
**Kuva 4. Liposomien muodostuminen yksittäisten fosfolipidien (a) järjestäytyessä spontaanisti ensin kaksoiskalvoiksi (b) ja lopulta pallomaiseksi kaksoiskalvorakenteeksi, liposomiksi (c), vesipitoisessa ympäristössä. Yksittäinen kaksoiskalvo (d) ( $\sim 5 \text{ nm}$  paksu) muodostuu, kun amfifiilisten fosfolipidien hydrofobiset ryhmät asettuvat kalvon ydintä kohden ja hydrofiiliset ryhmät kalvon ulkopuolen vesiympäristöön (muokattu lähteestä Jesorka ja Orwar 2008).**

Liposomien kaksoiskalvo koostuu pääasiassa fosfolipideistä, jotka ovat joko synteettisiä tai luonnosta peräisin olevia fosfolipidejä, pääosin fosfatidyylikoliineja (PC) (Meisner ja Mezei 1995, Lian ja Ho 2001). Fosfolipidit ovat varaukseltaan joko neutraaleja fosfolipidejä, kuten distearoyylifosfatidyylikoliini (DSPC), dipalmitoyylifosfatidyylikoliini (DPPC), tai negatiivisesti varautuneita fosfolipidejä, kuten disetyylifosfaatti (DCP) (Samad ym. 2007, Jesorka ja Orwar 2008). Positiivisesti varautuneita liposomeja saadaan valmistettua lisäämällä liposomin fosfolipidikoostumukseen positiivisesti varautunutta stearyyliamiinia (SA). Liposomien lipidikoostumuksesta riippuen liposomit omaavat joko negatiivisen, positiivisen tai neutraalin pintavarauksen.

Fosfolipidien lisäksi liposomien kalvorakenteeseen lisätään yleensä kolesterolia (Lian ja Ho 2001) (kuva 5). Kolesterolin lisäyksen tarkoituksena on parantaa liposomin kaksoiskalvon ominaisuuksia (Vermuri ja Rhodes 1995). Kolesteroli lisää

liposomin stabiilisuutta jäykistämällä sen nestemäistä fosfolipidikaksoiskalvoa. Lisäksi se alentaa kapseloidun lääkeaineen läpäisevyyttä kaksoiskalvon läpi ja siten parantaa liposomien kapselointitehokkuutta (Hathout ym. 2007, Mehanna ym. 2009, Shafaa ym. 2011a).

Liposomin kaksoiskalvon pintaan kiinnitetään usein hydrofiilisiä polymeerejä, kuten kitosaaneja. Tämän päällystämisen tarkoituksena on kaksoiskalvon stabilointi sekä mm. liposomien mukoadhesiivisten ominaisuuksien parantaminen (Mehanna ym. 2010).



**Kuva 5. Kolesterolin rakennekaava (muokattu lähteestä Vemuri ja Rhodes 1995).**

Liposomit voidaan jakaa niiden rakenteen ja koon mukaan eri tyyppisiin (Kaur ym. 2004, Samad ym. 2007, Jesorka ja Orwar 2008, Mishra ym. 2010). Rakenteellisesti liposomit voidaan jakaa kahteen ryhmään niiden sisältämien lipidikaksoiskalvojen lukumäärän mukaan: yksikerroksiset ja monikerroksiset liposomit (kuva 3). Liposomien koko vaihtelee 10 nm:n ja 10 µm:n välillä (Samad ym. 2007). Liposomien koon mukaan liposomit voidaan jaotella neljään pääluokkaan: pienet yksikerroksiset liposomit (SUV), suuret yksikerroksiset liposomit (LUV), valtavat yksikerroksiset liposomit (GUV) sekä suuret monikerroksiset liposomit (MLV) (taulukko 1, kuva 3). Yhdestä lipidikalvosta koostuvat yksikerroksiset liposomit (SUV, LUV ja GUV) ovat erityisen käytettyjä tutkimuksissa, koska niiden kalvon ominaisuudet tunnetaan hyvin ja koska niiden valmistaminen on helppoa (Jesorka ja Orwar 2008). Useammasta

fosfolipidikalvosta koostuvia MLV-liposomeja sen sijaan käytetään usein teollisuuden sovelluksissa, kuten lääkkeiden annostelussa.

**Taulukko 1. Eri liposomityypit ja niiden koot.**

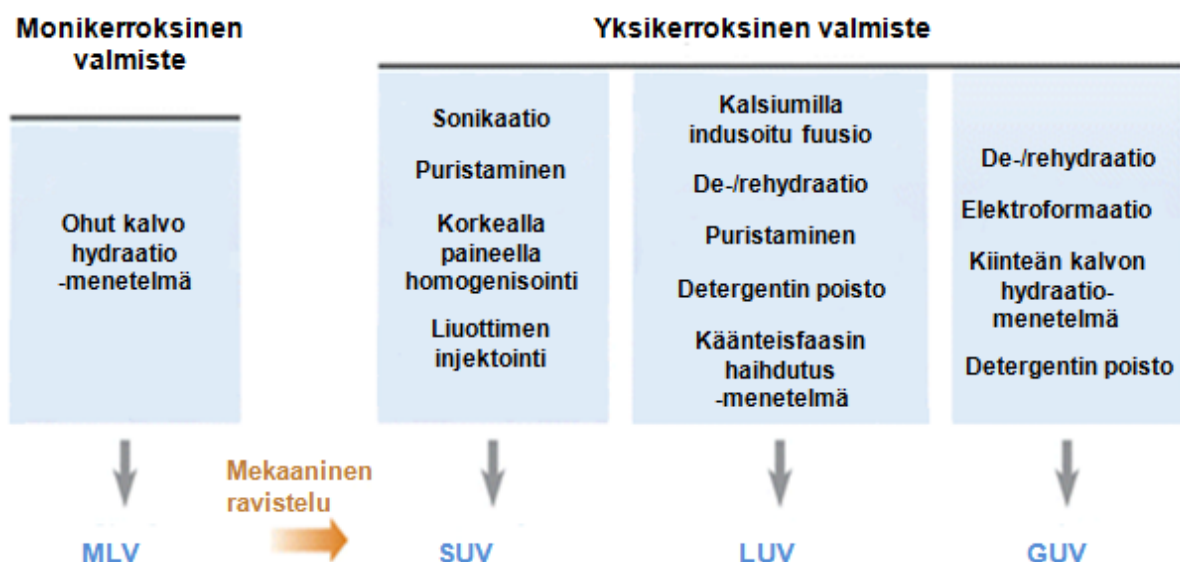
<b>Liposomityyppi</b>	<b>koko</b>
SUV (Pieni yksikerroksinen liposomi)	20 nm ~ 100 nm
LUV (Suuri yksikerroksinen liposomi)	200 nm ~ 1µm
GUV (Valtava yksikerroksinen liposomi)	>1 µm
MLV (Suuri monikerroksinen liposomi)	>5 µm

Lähde: Jesorka ja Orwar 2008

### 3 LIPOSOMIEN VALMISTUSMENETELMÄT

Liposomien valmistamiseen on olemassa useita eri menetelmiä (kuva 6) (Meure ym. 2008). Kaikkien valmistusmenetelmien tavoitteena on pyrkimys valmistaa liposomeja, joilla olisi korkeat kapselointitehokkuudet, kapeat kokojakaumat, hyvät säilyvyydet sekä lääkeainetta suojaavat vaikutukset (Mozafari 2005). Edellä mainittujen vaatimusten lisäksi valmistusmenetelmän tulisi olla kustannuksiltaan edullinen, nopea sekä yksinkertainen. Jotta kyseiset tavoitteet saavutettaisiin, liposomien valmistusmenetelmiä kehitetään koko ajan.

Liposomien valmistusmenetelmät voidaan jakaa perinteisiin ja kehittyneimpiin valmistusmenetelmiin (Meure ym. 2008). Perinteisiin valmistusmenetelmiin kuuluvat mm. Bangham, detergentin poisto, eetteri- tai etanoli-injektio, käänteisfaasin haihdutus –menetelmä (*engl. reverse phase evaporation*) sekä emulgointimenetelmä. Kehittyneempiä menetelmiä ovat mm. lämmitys –menetelmä (*engl. heating*) sekä yksifaasiliuosten kylmäkuivaus. Liposomien eri vesikkelityypit ovat näiden eri valmistusmenetelmien tulosta (kuva 6) (Bochot ym. 2000).



Kuva 6. Eri liposomityyppien valmistusmenetelmät (muokattu lähteestä Jesorka ja Orwar 2008).

### **3.1 Monikerroksiset liposomit (MLV)**

Monikerroksisten liposomien yleisin valmistusmenetelmä on Bangham–menetelmä, joka tunnetaan myös nimillä käsini ravisteltu ja ohut kalvo hydraatio -menetelmä (Bangham ym. 1965, Samad ym. 2007, Meure ym. 2008). Yleisesti se on yksinkertaisin ja eniten käytetty liposomien valmistusmenetelmä. Kyseisen valmistusprosessin aikana MLV-liposomeja tuotetaan haihduttamalla lipidiseoksesta orgaaninen liuotin ja hydratoimalla muodostunutta lipidifilmiä vesipitoisessa ympäristössä (Jesorka ja Orwar 2008). Hydraation aikana lämpötilan tulee olla fosfolipidien faasitransitiolämpötilan ( $T_c$ ) yläpuolella, jotta fosfolipidit alkavat turvota ja hydratoitua spontaanisti muodostaen liposomeja.

Bangham–menetelmän tuloksena muodostuvat liposomit ovat kooltaan heterogeenisiä MLV-liposomeja (Meure ym. 2008). Valmistusmenetelmän etuna on sen yksinkertaisuus, mutta haittoina ovat menetelmän hitaus, liposomien heikko kapselointitehokkuus, koon kontrolloimattomuus, sekä orgaanisen liuottimen suuri määrä. Lisäksi kyseinen menetelmä ei sovellu suurien määrien valmistamiseen (Vermuri ja Rhodes 1995). MLV-liposomien kapselointitehoa voidaan kuitenkin parantaa käsittelemällä liposomit jäädytys-sulatusmenetelmällä (Ohsawa ym. 1984).

### **3.2 Pienet yksikerroksiset liposomit (SUV)**

Pienten ja isojen yksikerroksisten liposomien valmistamiseen on olemassa useita eri menetelmiä. Yleisimpiin valmistusmenetelmiin kuuluvat MLV-liposomien jälkiprosessointi, jossa MLV-liposomeista valmistetaan yksikerroksisia liposomeja käyttämällä erilaisia mekaanisia menetelmiä, kuten sonikaatiota, puristamista ja korkealla paineella homogenisointia (Jesorka ja Orwar 2008, Meure ym. 2008).

Sonikaatio eli ultraäänikäsitteily on yksinkertaisin menetelmä liposomien koon pienentämiseen. Sen avulla saadaan valmistettua halkaisijaltaan 15-25 nm:n SUV-liposomeja (Szoka ja Papahadjopoulos 1980, Samad ym. 2007, Watve ja Bellare 1995). Ekstruutiossa eli puristamisessa sen sijaan MLV-liposomit työnnetään



paineella polykarbonaattimembraanin läpi (Jesorka ja Orwar 2008). Tuloksena saadaan muodostettua joko SUV- tai LUV-liposomeja riippuen suodattimen huokoskoosta. Muita SUV-liposomien valmistusmenetelmiä ovat MLV-liposomien homogenisointi korkean paineen avulla ja liuottimen injektioimismenetelmät, kuten etanolin ja eetterin injektioiminen puskuriliuokseen (Szoka ja Papahadjopoulos 1980, Watve ja Bellare 1995). Etanoli-injektiossa etanoliin liuotetut lipidit injektoidaan nopeasti puskuriliuokseen, jolloin muodostuu spontaanisti liposomeja (Vermuri ja Rhodes 1995, Meure ym. 2008). Etanoli-injektio on yksinkertainen ja nopea tapa valmistaa SUV-liposomeja, mutta lipidien on liuettava etanoliin homogeenisen lopputuotteen aikaansaamiseksi. Lisäksi menetelmän haittana on orgaanisen liuottimen jäämät valmiissa tuotteessa. Eetteri-injektiossa sen sijaan eetteri-lipidi-seos injektoidaan hitaasti nestemäiseen liuokseen, joka on lämmitetty nopeuttamaan liuottimen poistoa.

### **3.3 Suuret yksikerroksiset liposomit (LUV)**

Isot yksikerroksiset liposomit (LUV) pystyvät kapseloimaan sisäänsä suurempia määriä liuosta ja siten omaavat korkeamman kapselointitehokkuuden kuin MLV-liposomit (Vemuri ja Rhodes 1995). Isojen yksikerroksisten liposomien (LUV) tavallisin valmistustapa on käänteisfaasin haihdutus -menetelmä (*engl. reverse phase evaporation*) (Szoka ja Papahadjopoulos 1980, Watve ja Bellare 1995 Samad ym. 2007). Liposomit muodostuvat, kun lääkeainetta sisältävä vesifaasi ja fosfolipidien ja orgaanisen liuottimen seos sonikoidaan homogeeniseksi emulsioksi, minkä jälkeen orgaaninen liuotin haihdutetaan painetta alentamalla. Muodostuneita liposomeja kutsutaan käänteisfaasin haihdutus (REV) -liposomeiksi. REV-liposomit pystyvät kapseloimaan sisäänsä makromolekyylejä korkealla kapselointitehokkuudella. Menetelmä ei kuitenkaan sovi herkille aineille, kuten peptideille, sillä prosessin aikana kapseloitava aine joutuu kosketuksiin orgaanisen liuottimen kanssa. Muita LUV-liposomien valmistusmentelmiä ovat mm. edellä mainittu puristaminen, kalsiumin avulla indusoitu fuusio sekä detergentin poisto (Meure ym. 2008).

## 4 LIPOSOMIEN HYÖDYT SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ

Liposomeja on tutkittu 1970-luvulta alkaen nanokantajina, joiden avulla lääkeaineita voidaan kuljettaa tai kohdentaa tiettyyn elimistön kohtaan (Hosny 2010a). Kaurin ym. (2004) mukaan silmälääkinnässä liposomien potentiaali lääkeaineen kantajina havaittiin ensimmäistä kertaa Smolinin tutkimusryhmän 1980-luvulla tekemissä tutkimuksissa. Tuolloin havaittiin kaneilla tehtyjen tutkimuksien tuloksista, että liposomeihin kapseloidun idoksuridiinin teho oli *Herpes simplex* –viruksen aiheuttamaan sarveiskalvotulehdukseen merkittävästi parempi kuin idoksuridiinia sisältävän liuoksen. Vuosien kuluessa vastaavanlaisia tuloksia liposomien paremmasta tehosta tavanomaisiin silmävalmisteisiin verrattuna on havaittu myös muiden silmäsairauksien yhteydessä, kuten glaukooman (Shafaa ym. 2011a, Natarajan ym. 2011, Hathout 2007), kuivasilmäisyyden (Shafaa ym. 2011b), *Herpes simplex* –virusinfektioiden (Chetoni ym. 2004), suonikalvoston tulehduksen (Zhang ym. 2010) sekä sidekalvontulehduksen hoidossa (Budai ym. 2007).

Liposomien tarjoamia hyötyjä silmäsairauksien hoidossa on kuvattu monissa katsausartikkeleissa (Meisner ja Mezei 1995, Kaur ja Kanwar 2002, Kaur ym. 2004, Mainnades ym. 2005, Mishra ym. 2010). Niiden keskeisiä etuja ovat biohajoavaisuus, biologinen yhteensopivuus sekä turvallisuus (Kaur ym. 2004). Tämän mahdollistaa se, että liposomit voidaan valmistaa samoista rakenneosasista, joista biologiset membraanitkin muodostuvat. Samasta syystä liposomit ovat monien tutkimuksien mukaan hyvin siedettyjä sekä silmän etu- että takaosan soluissa (Moon ym. 2006, Abrishami ym. 2009, Hironaka ym. 2009, Habib ym. 2010, Zhang ym. 2010, Natarajan ym. 2011). Kuitenkin joidenkin liposomien rakenneosasten on havaittu olevan sytotoksisia ja ärsyttäviä silmälle. Stearyyliamiinia sisältävien positiivisesti varautuneiden liposomien sytotoksisuus ja silmä-ärsytys lisääntyivät, kun liposomien stearyyliamiinin pitoisuutta kasvatettiin (Taniguchi ym. 1988).

Liposomien potentiaalia silmälääkinnässä lisää niiden kyky toimia lääkeaineen kantajina monenlaisille lääkeaineille, proteiineille, nukleotideille sekä plasmideille (Mainnades ym. 2005). Tämän mahdollistaa liposomin kaksoiskalvon fosfolipidien amfiifilisyyden, jonka vuoksi liposomit pystyvät kapseloimaan sisäänsä sekä hydrofiilisiä että hydrofobisia lääkeaineita (Meisner ja Mezei 1995). Vesiliukoiset lääkeaineet

kapseloidaan liposomien sisällä olevaan vesifaasiin, jossa niiden konsentraatio riippuu liposomien sisään kapseloituneen veden määrästä sekä lääkeaineen liukoisuudesta vesifaasiin. Lipofiiliset lääkeaineet sen sijaan sidotaan yleensä liposomien lipidikalvoon tai liuotetaan kalvon lipidifaasiin. Esimerkkejä liposomeihin kapseloituista hydrofiilisistä silmälääkkeistä ovat muun muassa pilokarpiini (Monem ym. 2000), siprofloksasiini (Mehanna ym. 2009, Hosny 2010a) sekä flukonatsoli (Fawzia ym. 2010), ja lipofiilisistä lääkeaineista muun muassa latanoprosti (Natarajan ym. 2011), timololimaleaatti (Shafaa ym. 2011a), asikloviiri (Law ym. 2000, Chetoni ym. 2004) sekä asetatsoliamidi (El-Gazayerly ja Hikal 1997, Hathout ym. 2007).

Silmälääkinnän kannalta eräs liposomien merkittävimmistä hyödyistä on niiden kyky lisätä silmälääkkeiden hyötyosuutta sekä silmän etu- että takaosan annostelussa (Mishra ym. 2010). Liposomien avulla pystytään kohdentamaan ja ylläpitämään tarvittava lääkeainekonsentraatio halutulla vaikutusalueella pidempään parantaen näin lääkeaineen silmäimeytymistä (Bochot ym. 2000). Topikaalisessa annostelussa positiivisesti varautuneet liposomit sitoutuvat tehokkaasti sarveiskalvon pintaan, ja lisäävät siten lääkeaineen sarveiskalvoimeytymistä sekä aikaansaavat pitkittyneen lääkeaineen vaikutuksen. Esimerkiksi Shenin ja Tunin (2007) tutkimusryhmä raportoi, että liposomien avulla topikaalisesti annostellun gansikloviirin sarveiskalvoläpäisevyys oli 3,9 –kertainen korkeampi ja biologinen hyötyosuus silmässä 1,7 –kertainen suurempi kuin gansikloviiriliuoksella. Silmän takaosan intravitrealisessa annostelussa liposomien avulla voidaan pidentää lääkeaineiden puoliintumisaikaa ja lääkeaineen vaikutusta lasiaisessa (Bochot ja Fattal 2012). Esimerkiksi Bochot ym. (2002) havaitsivat, että liposomit pidensivät oligonukleotidien puoliintumisaikaa 6 tunnista 7 päivään suojelemalla oligonukleotideja nukleaasi-entsyymin aiheuttamalta hajoamiselta lasiaisessa.

Pitkittyneen lääkeainevaikutuksen kautta liposomit vähentävät myös silmävalmisteiden annostelukertoja ja lisäävät hoitomyöntyvyyttä (Fawzia ym. 2010). Fawzia ym. (2010) tutkimuksen *in vitro* –kokeiden tulokset osoittivat, että liposomaalisella flukonatsolilla saavutettiin pitkittynyt lääkeainevaikutus 12 tunnin ajan. Siten liposomeja hyödyntämällä flukonatsolisilmätippojen annostelukerrat pystyttiin vähentämään joka tuntisesta silmätippa-aplikoinnista kolme kertaa päivässä tapahtuvaan annosteluun. Annostelukertojen vähentyminen lisää hoitomyöntyvyyttä

erityisesti intravitreaalisen annostelun yhteydessä (Zhang ym. 2010). Esimerkiksi Abrishami ja kumppanit (2009) osoittivat tutkimuksessaan, että yhdellä bevasitsumabin liposomiformulaation intravitreaalisella injeksiolla voidaan ylläpitää bevasitsumabin terapeuttista pitoisuutta jopa yli 6 viikon ajan neovaskulaaristen silmätauteja hoidettaessa.

Lääkeaineiden toksisuutta voidaan myös vähentää liposomien avulla (Mainardes ym. 2005). Liposomit parantavat lääkeaineen silmäimeytymistä, ja siten lääkeaineen terapeuttiset pitoisuudet pystytään saavuttamaan pienemmillä pitoisuuksilla. Luonnollisesti lääkeaineannoksen pienentyminen vähentää lääkeaineen ärsyttävyyttä kudoksille sekä paikallisten silmälääkkeiden systeemisiä sivuvaikutuksia. Toisaalta liposomit vaikuttavat myös lääkeaineen farmakokinetiikkaan niin, että lääkeaine vapautuu hitaasti ja tasaisesti, jolloin välttyään lääkeaineen korkeilta toksisilta huippupitoisuuksilta (Velpandian ym. 2006, Gupta ym. 2000). Esimerkkinä tästä on Velpandianin ym. (2006) tutkimus, jossa tutkittiin flukonatsoliliuoksen ja liposomaalisen flukonatsolin retinaalista toksisuutta eri pitoisuuksilla intravitreaalisen injektion jälkeen kaneilla. Tutkimuksen tulokset osoittivat flukonatsoliliuoksen aiheuttavan pitoisuudella 100 µg/0,1 ml merkittäviä muutoksia kaniin verkkokalvoilla, kun taas liposomaalisen flukonatsolin ei havaittu aiheuttavan verkkokalvomutoksia pitoisuuksilla 100 µg/0,1 ml ja 200 µg/0,1 ml. Lääkeaineen hidas vapautuminen liposomeista alensi flukonatsolin retinaalista toksisuutta. Liposomien suojelevat myös lääkeainemolekyylejä metabolisilta entsyymeiltä, joita esiintyy kyynel-sarveiskalvoepiteelin rajapinnassa (Kaur ym. 2004, Ebrahim ym. 2005).

## **5 LIPOSOMIEN FYSIKAALIS-KEMIAALLISTEN OMINAISUUKSIEN VAIKUTUS LIPOSOMIFORMULAATION FARMOKOKINETIIKKAAN JA TERAPEUTTISEEN TEHOON SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ**

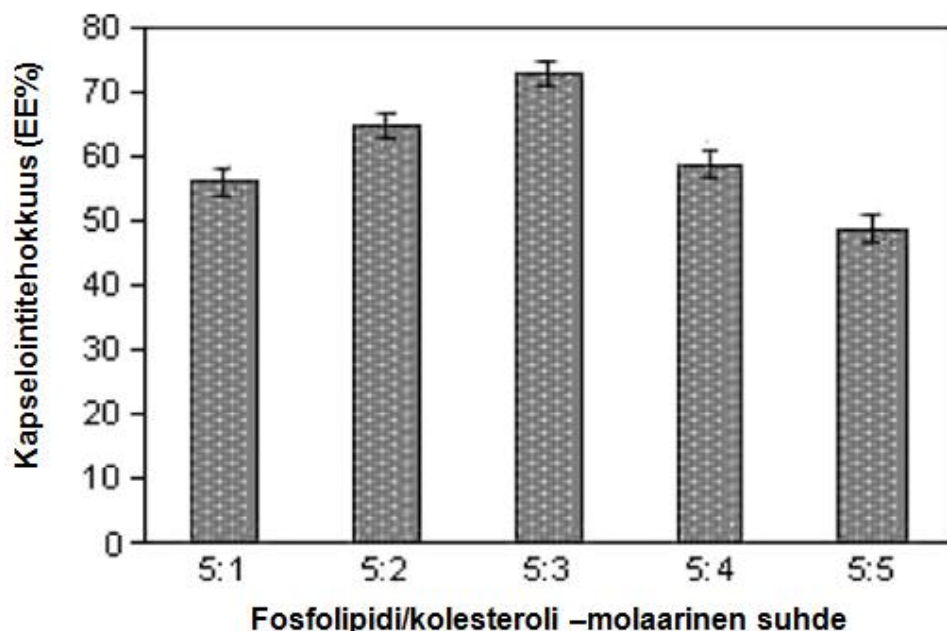
Liposomien lipidikoostumus, jäykkyys, varaus, kapselointitehokkuus sekä kapseloitavan aineen vapautumisnopeus ovat tekijöitä, jotka vaikuttava liposomien tehokkuuteen (Law ym. 2000). Näihin tekijöihin ja sitä kautta liposomien farmakokinetiikkaan voidaan vaikuttaa muuntelemalla liposomien fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia eli rakennetta, varausta ja kokoa tai valitsemalla sopiva valmistusmenetelmä sekä konjugoimalla liposomien pintaan bioadhesiivisiä polymeerejä. Liposomien merkittävänä etuna lääkeaineen kantajana onkin se, että näiden fysikokemiallisesten ominaisuuksien optimoinnilla voidaan modifioida liposomien toiminta aina tiettyyn tarkoitukseen sopivaksi (Kaur ym. 2004).

### **5.1 Kolesterolipitoisuus**

Liposomien kalvorakenteeseen lisätään usein kolesterolia eri pitoisuuksina (Vermuri ja Rhodes 1995). Kolesterolilisäyksen tavoitteena on yleensä liposomien kaksoiskalvon stabiloiminen ja kalvon läpäisevyyden vähentäminen. Nämä muutokset ovat johtuvat siitä, että kolesterolipitoisuus vaikuttaa liposomien fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, kuten kokoon. Liposomin koko kasvaa kaksoiskalvon kolesterolipitoisuuden kasvaessa (Mehanna ym. 2009). Kolesterolin rasvaliukoisuus ja rakenteelliset ominaisuudet edesauttavat kolesterolin kykyä täyttää fosfolipidien välissä olevat tyhjät aukot kasvattaen sitten liposomien kokoa.

Kun kaksoiskalvon kolesterolin pitoisuutta kasvatetaan, liposomien kapselointiteho kasvaa (Hathout ym. 2007, Mehanna ym. 2009, Zhang ym. 2009, El-Nesr ym. 2010, Hosny 2009, Zhang ym. 2009, Hosny 2010a ja 2010b, Shafaa ym. 2011a). Syynä tähän on kaksoiskalvon jäykkyyden lisääntyminen kolesterolipitoisuuden kasvaessa. Jäykkyyden kasvu parantaa kaksoiskalvon stabiilisuutta sekä vähentää kalvon läpäisevyyttä, mikä suurentaa siten liposomeihin kapseloituvan lääkeaineen määrää.

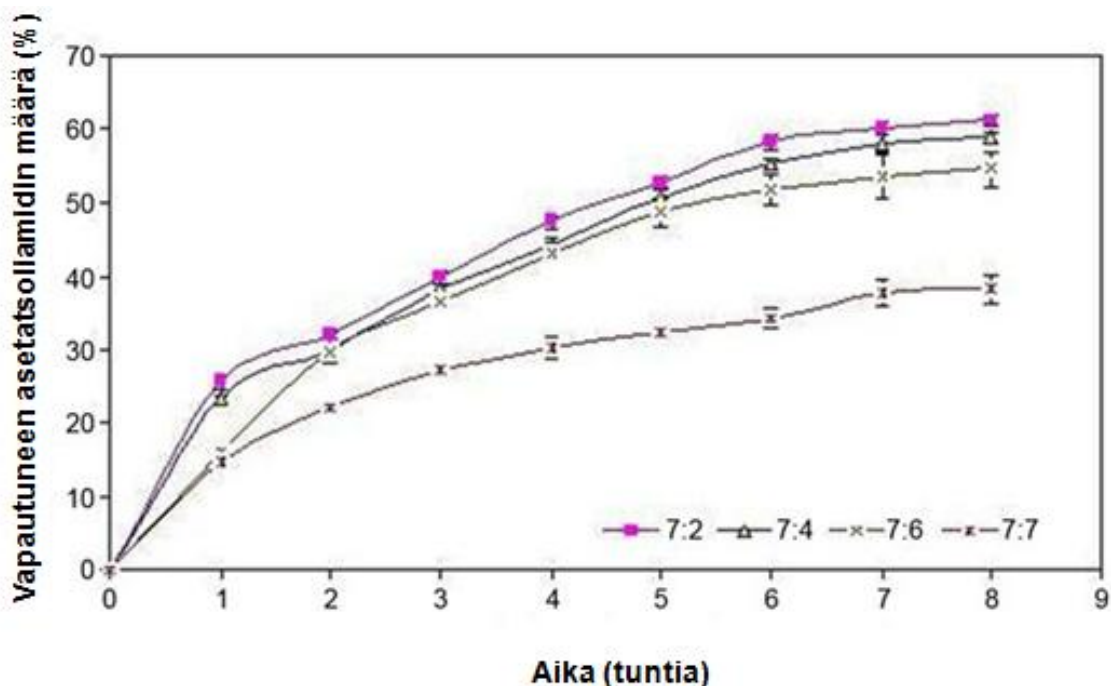
Esimerkiksi El-Nesrin tutkimusryhmä (2010) tutkivat kolesterolin vaikutusta MLV-liposomien kykyyn kapseloida flukonatsolia. Ainoastaan fosfatidyylikoliinista valmistettujen liposomien kapselointitehokkuus oli 23,1 %. Kolesterolipitoisuutta kasvatettaessa kapselointitehokkuus kasvoi, ja oli suurimmillaan 59,9 % fosfolipidi/kolesteroli –molaarisen suhteen ollessa 1:0,8. Muutamissa tutkimuksissa on myös havaittu, että kapselointiteho kasvaa vain tiettyyn kolesterolipitoisuuteen asti (Hosny 2009, Zhang ym. 2009, Hosny 2010a ja 2010b). Hosny (2010a) havaitsi, että korkein liposomien kapselointitehokkuus ( $73,0 \pm 3,0$ ) saavutettiin fosfolipidi/kolesteroli –molaarisella suhteella 5:3, jonka jälkeen kapselointitehokkuus pieneni kolesteroliosuuden kasvaessa (kuva 7). Kapselointitehokkuuden pieneneminen kolesterolipitoisuuden ylittäessä tietyn rajan saattaa johtua siitä, että kolesterolin pitoisuuden kasvu haittaa liposomien kaksoiskalvon säännöllistä lineaarista rakennetta.



**Kuva 7. Fosfolipidi/kolesteroli –molaarisen suhteen vaikutus siprofloksasiinin kapselointitehoon (EE%) ( keskiarvo±keskihajonta, n=3) (Hosny 2010a).**

Liposomien kaksoiskalvon kolesterolipitoisuudella on vaikutusta lääkeaineen *in vitro* -vapautumiseen liposomeista. Kolesteroli stabiloi liposomin fosfolipidikalvon sekä hidastaa liposomin sisään kapseloidun lääkeaineen kulkeutumista fosfolipidikalvon

läpi (Perschka ym. 1998). Lipidikalvon kolesterolin molaarista osuutta kasvattaessa lääkeaineen vapautuminen liposomeista hidastuu asteittain (Hathout ym. 2007, El-Nesr ym. 2009, Mehanna ym. 2009 ja Shafaa ym. 2011a). Hathout ym. (2007) raportoivat vapautuneiden lääkeaineosuuksien pienentymisestä 59,05 %:sta 38,28 %:iin kolesterolipitoisuuden kasvaessa (kuva 8). Syynä tähän uskotaan olevan kolesterolipitoisuuden vaikutus fosfolipidien faasitransitiolämpötilaan ( $T_c$ ) (Lian ja Ho 2001). Kolesterolipitoisuuden ollessa tarpeeksi suuri (>30 mol%) aiheuttaa se lämpötilan nousun fosfolipidien faasitransitiolämpötilan ( $T_c$ ) yläpuolelle. Tämä jäykistää kaksoiskalvoa rajoittamalla sen hiilivetyketjujen liikehdintää niin, että kaksoiskalvon läpäisevyys huononee (Nagarsenker ja Londhe 2003). Kaksoiskalvon läpäisevyyden huonontuminen hidastaa lääkeaineen *in vitro* vapautumista liposomeista (Perschka ym. 1998). Toisaalta liposomin kaksoiskalvon korkea kolesterolipitoisuus voi huonontaa lääkeaineen biologista hyötyosuutta. Liian korkea kolesterolipitoisuus tiukentaa kaksoiskalvon molekulaarista pakkaantumista niin, että kaksoiskalvon läpäisevyys ja siten lääkeaineen vapautuminen liposomeista huonontuu liikaa (Hathout ym. 2007).



**Kuva 8. Kolesterolipitoisuuden vaikutus asetatsolamidin vapautumiseen REV-liposomeista (muokattu lähteestä Hathout ym. 2007).**

Edellä mainittujen vaikutuksien lisäksi liposomin kaksoiskalvon kolesterolipitoisuus vaikuttaa myös liposomien kykyyn kuljettaa lääkeainetta verkkokalvolle (Inokuchi ym. 2010). Inokuchi ym. (2010) raportoivat, että liposomin kyky kuljettaa siihen kapseloitua kumariini-6:ta verkkokalvolle huonontui kolesterolipitoisuuden kasvaessa. Tämä oli kuitenkin seurausta siitä, että kyseisessä tutkimuksessa kolesteroli oli toiminutkin stabiloijan sijasta pehmentäjänä formulaatiossa, joka koostui tyydyttämättömästä fosfatidyylikoliinista (DSPC).

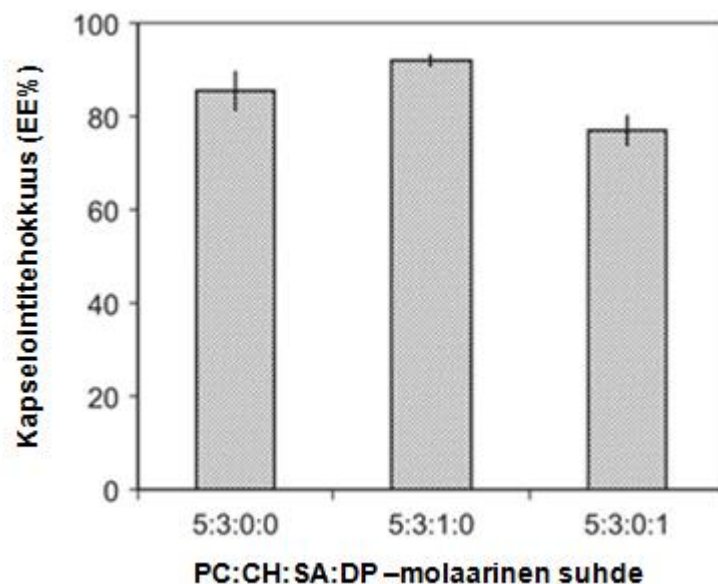
## 5.2 Pintavaraus

Silmään tapahtuvassa annostelussa liposomien pintavaraus on keskeinen ominaisuus, joka vaikuttaa liposomien toimivuuteen ( Law ym. 2000, Kaur ym. 2004, Rabinovich-Guilatt ym. 2004). Pintavaraus vaikuttaa liposomien kapselointitehokkuuteen, partikkelikokoon, *in vitro* vapautumiseen, stabiilisuuteen sekä kapseloidun lääkeaineen terapeuttiseen tehoon. Liposomit voivat olla varaukseltaan neutraaleja tai positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita riippuen niiden fosfolipidikoostumuksesta sekä pH:sta (Lian ja Ho 2001).

Liposomin pintavarauksen vaikutus liposomin kapselointitehokkuuteen on riippuvainen kapseloitavan lääkeaineen luonteesta. Positiivisesti tai negatiivisesti varautuneiden ja neutraalien liposomien erot kapselointitehokkuuksissa aiheutuvat lääkeaineen ja fosfolipidien välillä olevien sidosvoimien erilaisista vahvuuksista riippuen siitä, onko lääkeaineella happo- vai emäsluonnetta (El-Gazayerly ja Hikal 1997, Hathout ym. 2007, Hosny 2009, Hosny 2010a, Hosny 2010b, Shafaa ym. 2011a). El-Gazayerly ja Hikalin (1997) tutkivat liposomien eri pintavarauksien vaikutusta liposomien kykyyn kapseloida asetatsoliamidia sisäänsä. Positiivisesti varautuneille liposomeille mitattiin kapselointitehoksi 49,58 %, neutraaleilla liposomeilla 41,06 % ja negatiivisesti varautuneilla liposomeilla oli alhaisin kapselointiteho (29,27 %) käyttäen samoja fosfolipidikoostumuksia. Asetatsoliamidi on heikko happo, jolloin sen ja positiivisesti varautuneen stearyyliamiinin välille muodostuu elektrostaattisia vetovoimia, jotka tehostavat asetatsoliamidin



kapseloitumista positiivisesti varautuneiden liposomien sisään. Vastaavasti negatiivisesti varautuneiden liposomien kohdalla asetatsoliamidin ja negatiivisesti varautuneen disetyylifosfaatin välille muodostuvat elektrostaattiset repulsiovoimat ovat syynä sille, miksi negatiivisesti varautuneilla liposomeilla on alhaisempi kapselointitehokkuus kuin neutraaleilla liposomeilla. Vastaavanlaisia tuloksia eri varauksellisten liposomien kapselointitehokkuuksista on saatu myös muiden silmälääkkeiden, kuten ofloksasiinin (Hosny 2009), siprofloksasiinin (Hosny 2010a), sekä gatifloksasiinin (kuva 9) (Hosny 2010b) kohdalla, jotka ovat kahtaisioneja ja ovat pH:ssa 7,4 anionimuodossa. Toisaalta Zhang ja kumppaneiden (2009) tutkiessa stearyyliamiinin vaikutusta liposomien kykyyn kapseloida sytokromi c:tä he havaitsivat, että kapselointitehokkuus laski stearyyliamiinin pitoisuuden kasvaessa. Sytokromi c on varaukseltaan positiivinen proteiini, minkä vuoksi sen ja positiivisesti varautuneen stearyyliamiinin välille muodostuvat repulsiovoimat huonontavatkin liposomien kapselointitehokkuutta.

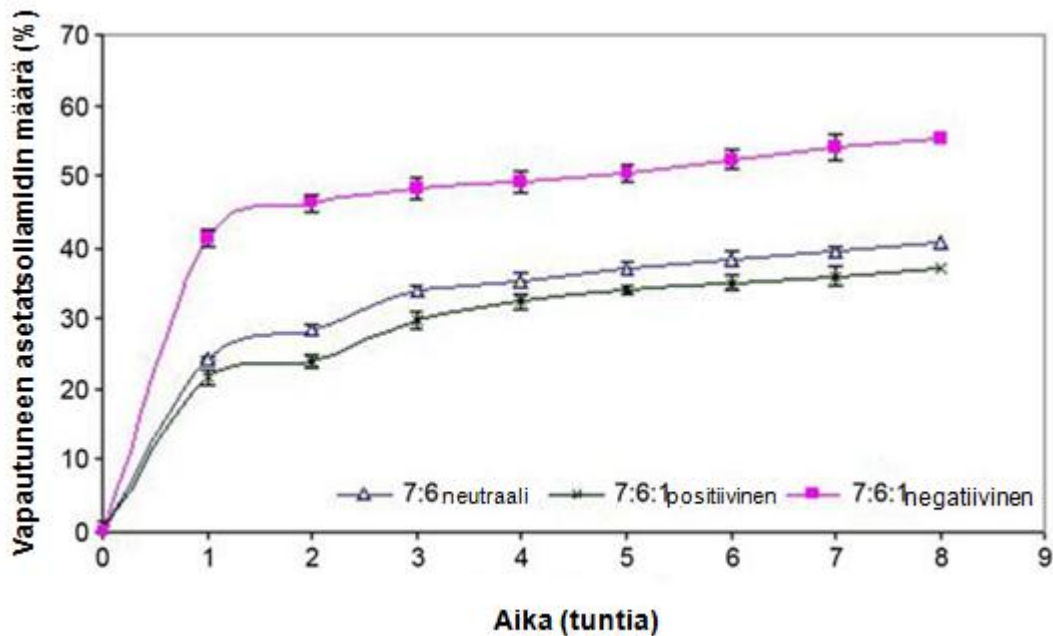


**Kuva 9. Pintavarauksen vaikutus gatifloksasiinin kapselointitehoon (EE%) (keskiarvo±keskihajonta, n=3) (Hosny 2010b). Kuvassa: PC=fosfatidyylikoliini, CH=kolesteroli, SA=stearyyliamiini, DP=disetyylifosfaatti**

Eri pintavarauksen omaavien liposomien koossa on eroavaisuuksia, jotka johtuvat useasta tekijästä (Hathout ym. 2007, El-Nesr ym. 2009, Hosny 2010a, Hosny 2010b).

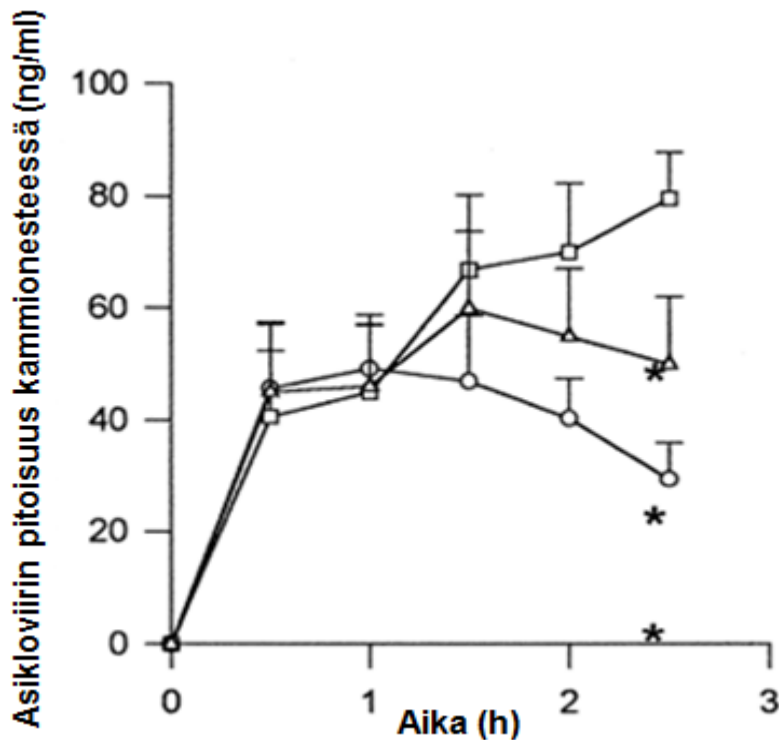
Hosny (2010a) mittasi siprofloksasiinia sisältäville positiivisesti tai negatiivisesti varautuneille sekä neutraaleille liposomeille halkaisijat 1960, 1840 ja 1750 nm samassa järjestyksessä. Positiivisesti varautuneiden liposomien suurempi halkaisija johtui ensinnäkin lääkeaineen happoluonteesta. Positiivisesti varautuneen fosfolipidin ja siprofloksasiinin anioinin välille syntyy elektrostaattinen vetovoima, joka työntää fosfolipidien päätyryhmiä kauemmaksi toisistaan kasvattaen liposomien halkaisijaa. Lisäksi kyseisessä tutkimuksessa positiivisesti varautuneilla liposomeilla oli suurimmat kapselointitehokkuudet, minkä vuoksi ne pystyivät kapseloimaan sisään suuremman määrän lääkeainetta kuin negatiivisesti varautuneet tai neutraalit liposomit. Toisaalta pintavarauksen aiheuttavan aineosasen sisällyttäminen liposomin kaksoiskalvoon kasvattaa normaalisti lähekkäin olevien fosfolipidikaksoiskalvojen etäisyyttä toisistaan (Nagarsenker ym. 1999). Tästä syystä joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneilla liposomeilla on yleisesti suurempi halkaisija kuin neutraaleilla (Hathout ym. 2007, Hosny 2010a, Hosny 2010b).

Kapselointitehokkuuden ja koon lisäksi liposomien pintavarauksella on vaikutusta myös liposomin kykyyn vapauttaa lääkeainetta *in vitro*. Useissa tutkimuksissa on havaittu, että negatiivisesti varautuneet liposomit vapauttavat lääkeainetta nopeimmin ja määrällisesti eniten, kun hitaimmin lääkeainetta vapauttavat positiivisesti varautuneet liposomit (El-Gazayerly ja Hikal 1997, Chetoni ym. 2004, Hathout ym. 2007, El-Nesr ym. 2009, Mehanna ym. 2009, Hosny 2010a, Hosny 2010b) (kuva 10). Syynä tähän järjestykseen on kyseisissä tutkimuksissa käytettyjen lääkeaineiden happorakenteen ja stearyyliamiinin amino-osan välille syntyvät elektrostaattiset vetovoimat, jotka hidastavat lääkeaineen vapautumista liposomista. Sen sijaan negatiivisesti varautuneiden liposomien korkeimpaan lääkeaineen vapautumisprosenttiin on syynä mahdolliset repulsiovoimat negatiivisesti varautuneen liposomin ja lääkeaineen välillä. Lisäksi varautuneiden liposomien on havaittu tiukentavan liposomin fosfolipidikaksoiskalvon molekulaarista pakkautumista aiheuttaen näin lääkeaineen vapautumisen huonontumista kyseisistä liposomista (El-Gazayerly ja Hikal 1997).



**Kuva 10. Liposomin pintavarauksen vaikutus asetatsolimidin vapautumiseen liposomeista (muokattu lähteestä Hathout ym. 2007).**

Lääkeaineen kulkeutumiseen sarveiskalvon läpi *in vivo* ja siten liposomin sisään kapseloidun lääkeaineen terapeuttiseen tehoon liposomin pintavarauksella on merkittävä vaikutus (Schaeffer ja Krohn 1982, Law ym. 2000, Hosny 2010a, Hosny 2010b). Schaeffer ja Krohn (1982) tutkivat penisilliini G:n kulkeutumista sarveiskalvon läpi käytettäessä MLV- ja SUV-liposomeja eri pintavarauksilla. *In vivo* tutkimukset liposomien ja sarveiskalvon vuorovaikutuksesta osoittivat, että liposomit kulkeutuivat sarveiskalvon läpi järjestyksessä  $MLV^+ > SUV^+ > MLV^- > SUV^- > MLV = SUV$ . Positiivisesti varautuneet liposomit lisäsivät selvästi penisilliini G:n läpäisevyyttä *in vitro* verrattuna negatiivisesti varautuneisiin ja neutraaleihin liposomeihin. Samanlaisia tuloksia saivat Law ym. (2000) ja Cortesi ym. (2006), jotka raportoivat positiivisesti varautuneisiin liposomeihin kapseloidun lääkeaineen imeytyvän paremmin sarveiskalvolta ja saavuttavan siten myös pitkittyneemmän imeytymisprofiilin kuin negatiivisesti varautuneet liposomit (kuva 11). Syyksi positiivisten liposomien parempaan sarveiskalvoläpäisevyyteen uskotaan olevan negatiivisesti varautunut sarveiskalvo, jonka pintaan positiivisesti varautuneet liposomit sitoutuvat voimakkaasti.



**Kuva 11. Asikloviirin (ACV) konsentraatio ajan suhteen kaniinien kammionesteessä annosteltaessa asikloviiriliuosta ja asikloviiriä sisältäviä liposomeja: ACV liuos(○), positiivisesti varautuneet liposomit (□), negatiivisesti varautuneet liposomit (Δ). \* tilastollisesti merkittävä;  $p < 0,05$  (n=6) (muokattu lähteestä Law ym. 2000).**

Positiivisesti varautuneisiin kapseloidun lääkeaineen paremman kulkeutumisen sarveiskalvon läpi uskotaan johtuvan elektrostaattisesta vetovoimasta, joka muodostuu negatiivisesti varautuneen sarveiskalvon ja positiivisesti varautuneiden liposomien välille. Vetovoiman seurauksena positiivisesti varautuneet liposomit sitoutuvat tiukasti sarveiskalvon pintaan muodostaen lopulta sarveiskalvon pintaa peittävän kerroksen (Kaur ym. 2004, Law ym. 2000). Tämä pidentää liposomien vaikutusaikaa sarveiskalvolla, sekä tehostaa lääkeaineen imeytymistä aikaansaamalla siten pitkittyneen lääkeaineen vaikutuksen. Lisäksi positiivisesti varautuneiden liposomien ja sarveiskalvon keskinäisen vuorovaikutuksen uskotaan hidastavan lääkeaineen eliminoitumista kyynelneesten mukana yhdessä positiivisten liposomien aiheuttaman viskositeetin kasvun kanssa (Law ym. 2000). Shafaa ym. (2007) sekä El-Gazayerly ja Hikal (1997) raportoivat positiivisesti varautuneisiin MLV-liposomeihin kapseloidun asetatsoliamidin alentavan silmän sisäistä painetta enemmän (-7 mmHg) ja pidempään (160 h) kuin negatiivisesti varautuneet MLV-

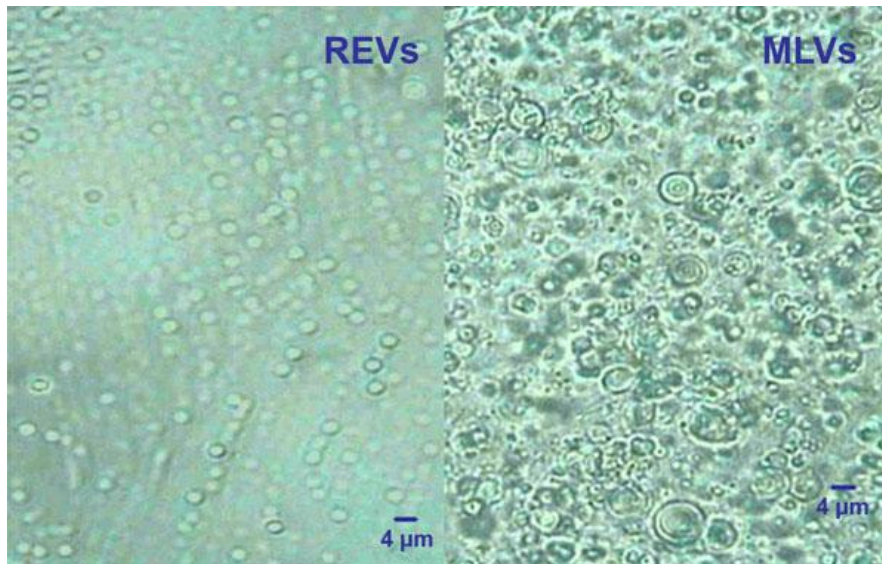
liposomit. Vastaavanlaisia tuloksia on saatu muidenkin silmänpainetta laskevien lääkeaineiden kohdalla, kuten timololimaleaatin kohdalla (Shafaa ym. 2011a).

### 5.3 Liposomien valmistusmenetelmät (REV-MLV)

Liposomien eri vesikkelityypit omaavat erilaiset ominaisuudet, kuten koot, kapselointitehokkuudet sekä lääkeaineen *in vitro* vapautumisen liposomeista. Liposomien valmistusmenetelmän valinta onkin yksi keinoista muokata liposomiformulaation ominaisuuksia tarkoitukseen sopivaksi.

Useammasta fosfolipidikalvosta koostuvat MLV-liposomit kapseloivat tehokkaammin lääkeainetta sisäänsä kuin REV-liposomit käytettäessä samoja fosfolipidikoostumuksia (Budai ym. 2004, Hathout ym. 2007, Hosny 2009). MLV-liposomien suurempi kapselointitehokkuus johtunee niiden monikerroksisuudesta, jonka vuoksi ne pystyvät varastoimaan suurempia määriä lääkeainetta verrattuna yksikerroksisiin REV-liposomeihin.

MLV-liposomit ovat partikkelikooltaan suurempia kuin REV-liposomit (Hathout ym. 2007, Hosny 2009). Hosny (2009) raportoi positiivisesti varautuneiden MLV-liposomien halkaisijan olevan 9,34  $\mu\text{m}$ , kun taas vastaavasti REV-liposomien halkaisija oli 7,66  $\mu\text{m}$  (kuva 12). Syynä partikkelikoon erolle on valmistusmenetelmien erot vesikkelin muodostamisessa.



**Kuva 12. Asetatsoliamidin REV- ja MLV-liposomit, jotka ovat koostumukseltaan fosfatidyylikoliini:kolesteroli (7:4) (alkuperäinen suurennos x 400) (muokattu lähteestä Hathout ym. 2007).**

MLV-liposomien lipidikalvojen monikerroksisuus aiheuttaa myös eroja liposomien kyvyssä vapauttaa lääkeainetta *in vitro*. Hathout ym. (2007) raportoivat asetatsoliamidin *in vitro* vapautumisen MLV-liposomeista olevan hitaampaa kuin REV-liposomeista. MLV-liposomeissa hydrofobinen asetatsoliamidi on varastoitunut MLV-liposomien useisiin lipidikerroksiin, jonka vuoksi sen vapautuminen MLV-liposomeista on hitaampaa kuin yksikerroksisista REV-liposomeista. Samassa tutkimuksessa tutkittiin myös valmistusmenetelmän vaikutusta liposomiformulaation kykyyn alentaa silmänpainetta. Tulokset osoittivat, että MLV-liposomit alensivat silmänpainetta kaniineilla enemmän ja myös pidempiaikaisemmin kuin REV-liposomit johtuen juuri liposomityyppien erilaisesta rakenteesta.

## 5.4 Koko

Liposomien koko on tärkeä tekijä liposomiformulaation biologisen hyötyosuuden parantamisen kannalta (Kaur ym. 2004). Koon optimoinnilla voidaan vähentää silmän kyyneleritystä ja siten annostellun lääkeaineen huuhtoutumista parantaen hoidon tehokkuutta silmässä. Silmälääkinnässä käytettävien kiinteiden partikkelien

partikkelikoon on suositeltu olevan pienempiä kuin 10 µm silmä-ärsytyksen minimoimiseksi (Kaur ym. 2004, Kassem ym. 2007). Yleensä partikkelikoon pieneneminen lisää valmisteiden biologista hyötyosuutta, sillä koon pienenemisen on raportoitu pidentävän valmisteiden viipymistä silmän pinnalla (Kassem ym. 2007). Systemisesti annosteltaessa suositeltu liposomien partikkelikoko on alle 100 nm, jolloin seerumin proteiinien sitoutuminen liposomien pintaan on vähäisempää hidastaen näin liposomien poistumista verenkierrosta (Lian ja Ho 2001).

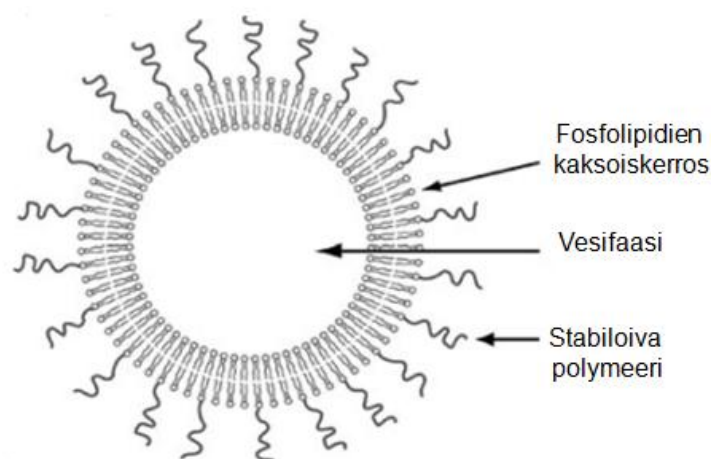
Liposomien koolla on merkitystä liposomiin kapseloituneen lääkeaineen kulkeutumiseen sarveiskalvon läpi (Schaeffer ja Krohn 1982, Shen ja Tu 2007). Schaeffer ja Krohn (1982) raportoivat, että yksikerroksisiin liposomeihin kapseloituneen penisilliini G:n kulkeutuminen sarveiskalvon läpi oli tehokkaampaa kuin monikerroksisiin liposomeihin kapseloituneen penisilliinin. Syynä uskotaan olevan yksikerroksisten liposomien pienemmän koon, joka mahdollistaa liposomien pääsyn lähemmäksi sarveiskalvoa helpottaen lääkeaineen kulkeutumista sarveiskalvon läpi.

Liposomien koon on havaittu olevan merkittävin tekijä lääkeaineen kulkeutumisessa verkkokalvolle topikaalisen annostelun jälkeen (Hironaka ym. 2009, Inokuchi ym. 2010). Inokuchi ym. (2010) tutkivat alle mikrometrin kokoisten liposomien (ssLips) fysikokemiallisten ominaisuuksien, kuten koon, vaikutusta niihin kapseloituneen kumariini-6:n kulkeutumiseen verkkokalvolle silmätippoina annosteltaessa. He raportoivat verkkokalvolle kulkeutuneen kumariini-6:n määrän merkittävästi lisääntyvän liposomiformulaatioiden koon pienentyessä alle mikrometriin. Syynä uskotaan olevan se, että nanokokoiset partikkelit omaavat suuremman kosketuspinta-alan silmän sarveis- ja sidekalvon kanssa.



## 5.5 Bioadhesiivisten polymeerien käyttö

Liposomien ominaisuuksia voidaan muunnella kiinnittämällä liposomien pintaan erilaisia bioadhesiivisiä polymeerejä (Kaur ym. 2004, Li ym. 2009). Bioadhesiiviset polymeerit ovat luonnosta peräisin olevia, synteettisiä tai semi-synteettisiä makromolekyylejä (Kaur ja Smitha 2002, Kaur ja Kanwar 2002). Ne sitoutuvat spontaanisti biologisiin kudoksiin, erityisesti limakalvon muslikerrokseen. Tämän mukoadheesio-ominaisuuden vuoksi bioadhesiiviset polymeerit sitoutuvat lujasti myös silmän negatiivisesti varautuneisiin sarveis- ja sidekalvoon pidentäen näin lääkeaineen kontaktiaikaa sarveiskalvolla (De Campos ym. 2001, Mehanna ym. 2010). Liposomien päällystäminen bioadhesiivisillä polymeereillä onkin tehokas keino topikaalisten silmävalmisteiden biologisen hyötyosuuden parantamiseen (kuva 13) (Mishra ym. 2010). Yhdistämisen avulla voidaan hyödyntää sekä liposomien tarjoamat mahdollisuudet monentyyppisten lääkeaineiden kuljettamiseen ja lääkeaineen biologisen hyötyosuuden parantamiseen että bioadhesiivisten polymeerien mukoadhesiivinen luonne. Polymeeripäällysteen avulla voidaan tehostaa liposomeihin kapseloituneen lääkeaineen imeytymistä sarveiskalvolla, sekä parantaa liposomien stabiilisuutta estämällä liposomien aggregoitumista säilytyksen aikana (De Campos ym. 200, Zhang ja Wang 2009).



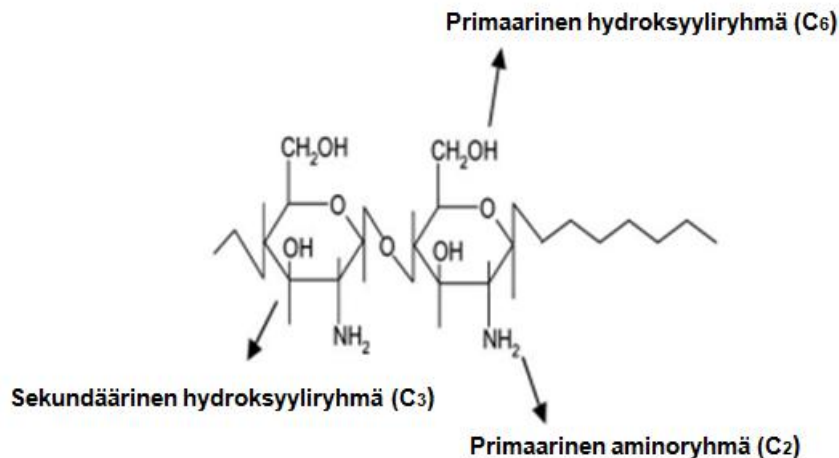
**Kuva 13. Liposomin rakenne, jossa fosfolipidipintaan on liitetty bioadhesiivinen polymeeri stabiloimaan liposomin rakennetta (muokattu lähteestä Meure ym. 2008).**



Liposomien päällystämiseen on käytetty lukuisia bioadhesiivisiä polymeerejä, kuten hyaluronihappoa, polyakryylihappoa ja kitosaania. Yksi yleisimmin käytetty polymeeri liposomien päällystämiseen on kitosaani sen hyvien biologisten ominaisuuksien takia (kuva 14) (Alonso ja Sanchez 2003, Zhang ja Wang 2009, Mehanna ym. 2010). Kitosaani on biologisesti yhteensopiva, hajoaa biologisesti lysosomien kautta, sekä omaa alhaisen toksisuuden (Sahoo ym. 2008). Kitosaanilla päällystettyjä liposomeja eli kitosomeja on käytetty parantamaan sarveiskalvoon tarttumista sekä liposomeihin kapseloidun lääkeaineen vapautumisen säätelyssä (Mehanna ym. 2010). Kitosaani onkin tarjonnut uuden keinon modifioida liposomien kuljetusominaisuuksia (Li ym. 2009).

Kitosaanipäällyste vaikuttaa moniin liposomien fysikokemiallisiin ominaisuuksiin, kuten liposomien kapselointitehokkuuteen ja partikkelikokoon. Liposomien kapselointitehokkuuteen kitosaanipäällysteen ei ole havaittu aiheuttavan merkittävää muutosta päällystämättömiin liposomeihin verrattuna (Jain ym. 2007, Li ym. 2009, Zhang ja Wang 2009). Mehannan tutkimusryhmä (2010) osoitti kuitenkin, että alhaisemman molekyylipainon omaavalla kitosaanilla päällystettyjen kitosomien kapselointitehokkuudet ovat korkeammat. Tämä on mahdollisesti selitettävissä sillä, että alhaisemman molekyylipainon omaava kitosaani ei pysty päällystämään liposomien pintaa riittävästi. Tämän johtaa siihen, että negatiivisesti varautuneen fosfolipidien kaksoiskerroksen ja positiivisesti varautuneen kitosaanin välille ei muodostu riittävästi vuorovaikutuksia, jolloin kapseloitua positiivisesti varautunutta siprofloksasiinia korvautuu vähemmän sen sitoutumispaikalta parantaen näin kitosomien kapselointitehokkuutta.

Liposomien partikkelikoko sen sijaan kasvaa hieman kitosaanilla päällystettäessä (Jain ym. 2007, Li ym. 2009, Zhang ja Wang 2009). Tämä on luonnollisesti seurausta kitosaanipeitteen muodostumisesta liposomin ympärille. Lisäksi tutkimuksissa on havaittu, että päällystettävän kitosaanin molekyylipaino ja kitosaanikonsentraatio vaikuttavat kitosomin kokoon (Mehanna ym. 2010). Kitosaanin molekyylipainoa pienentämällä ja konsentraatiota kasvattamalla kitosomin koko kasvaa. Alhaisten molekyylipainon omaavien kitosaanien nimittäin epäillään pienen kokonsa vuoksi päällystävän liposomien pinnan epätäydellisesti, mikä voi mahdollistaa liposomien yhdistymisen ja siten koon kasvun.

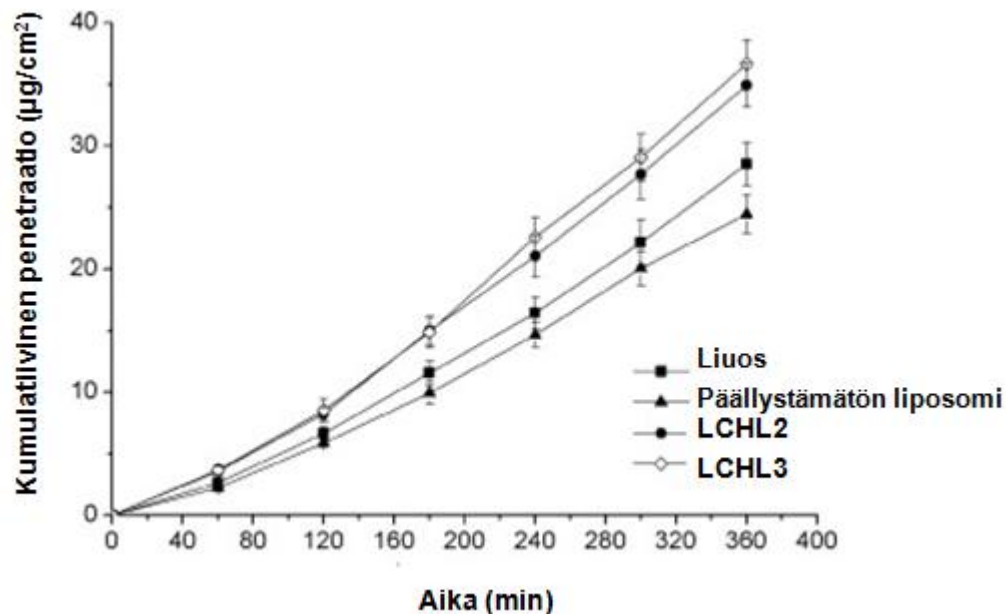


**Kuva 14. Rakennekuva kitosaanista (Wadhwa ym. 2009)**

Kitosomeilla on havaittu olevan merkittävästi pidemmät kontaktiajat sarveiskalvolla kuin päällystämättömillä liposomeilla (Alonso ja Sanchez 2003, Jain ym. 2007, Li ym. 2009, Zhang ja Wang 2009, Mehanna ym. 2010). Tämä on seurausta kitosaanin mukoadhesiivisesta luonteesta, joka johtuu positiivisesti varautuneen kitosaanin suuresta affiniteetista sitoutua negatiivisesti varautuneeseen sarveiskalvoon. Lisäksi Li ja kumppanit (2009) mukaan kitosomien pidempi kontaktiaika sarveiskalvolla olisi myös seurausta kitosaanimolekyylin vapaiden amino- ja hydroksyyliiryhmien muodostamista vetysidoksista silmän pinnan kanssa. Kitosaanipäällyste pidentää liposomien viipymisaikaa sarveiskalvolla myös, koska kitosaanilla on kyky estää lääkeaineen metaboloitumista sarveiskalvon epiteelin pinnalta (Zhang ja Wang 2009, Mishra ym. 2010).

Tutkimuksissa on havaittu, että kitosaani edistää liposomien sarveiskalvon läpäisevyyttä (kuva 15) (Alonso ja Sanchez 2003, Li ym. 2009, Zhang ja Wang 2009, Mehanna ym. 2010). Li ja kumppaneiden (2009) sarveiskalvon penetraatiokokeen tulokset osoittavat, että kitosomien permeabiliteettikerroin ( $1,174 \text{ cmmin}^{-1} \times 10^4$ ) on merkittävästi korkeampi kuin päällystämättömien liposomien ( $0,789 \text{ cmmin}^{-1} \times 10^4$ ). Havainnon uskotaan johtuvan edellä mainituista kitosaanin ja sarveiskalvon elektrostaattisista vuorovaikutuksista sekä vetysidoksista, joiden avulla kitosomit sitoutuvat voimakkaasti sarveiskalvolle. Lisäksi kitosaanilla on raportoitu olevan kyky

avata solujen välisiä tiiviitä liitoksia, joita tavataan paljon myös sarveiskalvon epiteelissä (Alonso ja Sanchez 2003).



**Kuva 15.** Erilaisiin vehikkeleihin kapseloidun diklofenaakkinatriumin sekä diklofenaakkinatriumliuoksen kulkeutumisprofiilit sarveiskalvon läpi (keskiarvo±keskihajonta, n=6). Kuvassa LCHL2= 0, 25 % (m/V) alhaisen molekyylipainon omaavalla kitosaanilla päälystetty liposomi, LCHL3= 0,5 % (m/V) alhaisen molekyylipainon omaavalla kitosaanilla päälystetty liposomi (muokattu lähteestä Li ym. 2009).

Liposomien kitosaanipäälyste vaikuttaa myös liposomien stabiilisuuteen säilytyksen aikana (Li ym. 2009, Zhang ym. 2009, Mehanna ym. 2010). Lin tutkimusryhmä (2009) tutki muun muassa kitosaanin vaikutusta liposomien stabiilisuuteen 30 vuorokauden säilytyksen aikana. Tuloksista nähdään, että päälystämättömien liposomien partikkelikoko kasvoi huomattavasti ja että niiden kapselointitehokkuus laski 99,6 %:sta 89,2 %:tiin johtuen lipidien hydrolyysistä sekä oksidaatiosta. Kitosomeilla sen sijaan vastaavat muutokset eivät olleet huomattavia. Kitosaanipäälyste todennäköisesti toimii suojakalvona estäen liposomien hajoamisen.

## 6 LIPOSOMIEN KÄYTTÖAIHEITA SILMÄLÄÄKINNÄSSÄ

### 6.1 Silmän etuosan käyttöaiheita

Topikaalisesti annostelusta lääkeaineesta vain alle 1-5 % imeytyy sarveiskalvon läpi (Järvinen ym. 1995). Liposomien hyödyntämistä erilaisten silmän etuosan sairauksien hoidossa on tutkittu paljon sekä *in vitro* että *in vivo* (taulukko 2) (Ebrahim ym. 2005).

Topikaalisesti ja sidekalvonalaisesti annosteltavien liposomiformulaatioiden tyypillisimmät käyttökohteet ovat olleet bakteerien, virusten ja sienten aiheuttamien silmän sidekalvon- ja sarveiskalvontulehduksien sekä glaukooman ja kuivasilmäisyyden hoito (Ebrahim ym. 2005). Sidekalvo- ja sarveiskalvontulehduksissa liposomit ovat toimineet lääkeaineiden nanokantajina parantaen näin niiden topikaalisen annostelun biologista hyötyosuutta, kulkeutumista sarveiskalvon läpi sekä lääkkeen vaikutusaikaa sarveiskalvolla. Fawzia ja kumppanit (2010) osoittivat *in vivo* kokeissaan, että liposomaalisen flukonatsolin antifungaalinen teho oli parempi kuin flukonatsoliliuoksella *Candida albicansin* aiheuttamassa sarveiskalvontulehduksen hoidossa. Flukonatsoliliuoksella hoidetuilla kaneilla tulehduksen parantumista tapahtui 50%:lla kaneista 3 viikon hoidon jälkeen, kun taas liposomaalisella flukonatsolilla hoidetuilla kaneilla parantumista tapahtui 86,4 %:lla. Liposomivalmisteiden paremman tehon tutkijat uskoivat aiheutuvan liposomiformulaation korkeammasta viskositeetistä sekä rasvaliukoisuudesta.

**Taulukko 2. Liposomiformulaatioiden vaikutuksia silmän etuosan sairauksien hoidossa.**

Lääkeaine	Käyttöaihe	Havainnot	Lähde
Timolimaleaatti	Glaukooma	Positiivisesti varautuneet liposomit alensivat silmän sisäistä painetta ja pidensivät lääkeaineen vaikutusta kaniineilla.	Shafaa ym. 2011a
Gansikloviiri	AIDS-CMV-retiniitti	<i>In vitro</i> kulkeutuminen sarveiskalvon läpi ja <i>in vivo</i> farmakokinetiikka silmässä parantuivat. Liposomien pitoisuus-aikakäyrän pinta-ala (AUC) oli 1,7 kertaa korkeampi kuin liuoksen.	Shen ja Tu 2007
Asetatsoliamidi	Glaukooma	Positiivisesti varautuneet ja neutraalit liposomit laskivat enemmän silmän sisäistä painetta ja aikaansivat pidemmän vaikutuksen kuin negatiivisesti varautuneet liposomit.	Hathout ym. 2007
Siprofloksasiini	Konjuktiviitti, keratiitti	Liposomaalisen hydrogeelin sarveiskalvoläpäisevyys oli viisi kertaa suurempi kuin liuoksen.	Hosny 2010a
Pilokarpiini	Glaukooma	Neutraalien liposomien silmänpainetta alentava vaikutus oli pidempi kuin negatiivisesti varautuneiden liposomien.	Monem ym. 2000
Gatifloksasiini	Konjuktiviitti, keratiitti	Liposomit aikaansivat lääkeaineen tasaisen ja pitkittyneen <i>in vitro</i> vapautumisen liposomeista.	Hosny 2010b
Flukonatsoli	Candida keratiitti	Liposomiformulaatio paransi tehokkaammin <i>C.albicans</i> -infektion kuin pelkkä liuos.	Habib ym. 2010
Tetrasykliini	Kuivasilmäisyys	Liposomit paransivat merkittävästi STT*- ja TBUT*-testien arvoja.	Shafaa ym. 2011b

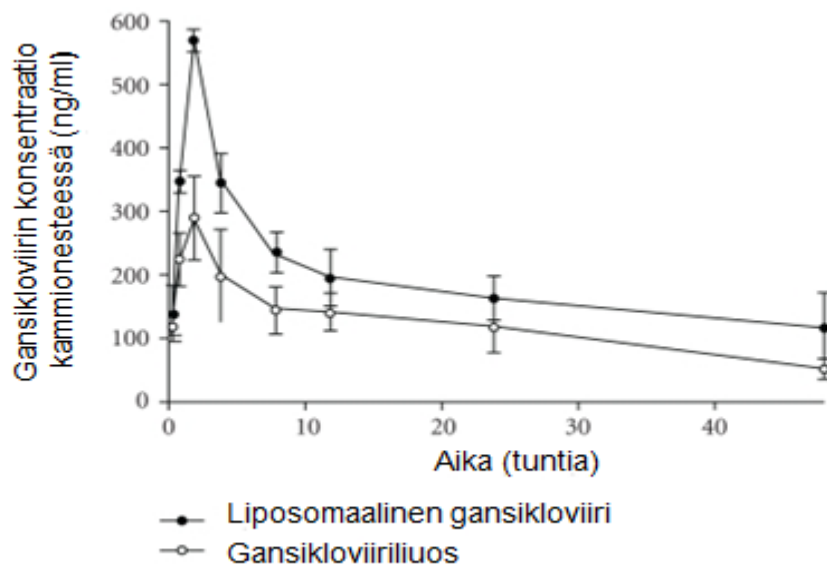
		Liposomeilla hoidetun silmän side- ja sarveiskalvon solurakenne normalisoitui.	
Levofloksasiini	Keratiitti	Liposomeilla päällystetyistä piilolinseistä lääkeaine vapautui 1.kertaluvun kinetiikalla yli 6 päivää, ja formulaatio osoitti antibakteerista aktiivisuutta <i>S.aureusta</i> vastaan.	Dannion ym. 2006
Kloramfenikoli	Keratiitti, konjuktiviitti	Liposomiformulaatiot omasivat hyvän antibakteerisen tehokkuuden <i>S. aureusta</i> vastaan.	Mahmoud ym. 2007
Latanoprosti	Glaukooma	Liposomaalinen latanoprosti alensi tehokkaasti silmänpainetta jopa 90 päivän ajan yhdellä sidekalvonalaisella injeksiolla.	Natarajan ym. 2012
Alhaisen molekyylipainon omaava hepariini (LMWH)	Sidekalvonalainen vuoto	Sidekalvon alaisesti injektoitu liposomaalinen LMWH paransi sidekalvon alaisen vuodon liukenemista kanin silmässä.	Moon ym. 2006
Streptokinaasi	Sidekalvon alainen vuoto	Sidekalvon alaisesti injektoitu liposomaalinen streptokinaasi paransi sidekalvon alaisen vuodon liukenemista, erityisesti alkuvaiheessa (24-48 h).	Baek ym. 2009

\*STT= Schirmerin liuskatesti, \*TBUT= Kyynelnesteen laatua mittaava testi (Tear Break Up Time)

Liposomiformulaatioiden käyttöä on tutkittu myös silmän sidekalvontulehdusten ja bakteerien aiheuttamien sarveiskalvontulehdusten hoidossa käytettävien fluorokinolien, kuten siprofloksasiinin, ofloksasiinin ja gatifloksasiinin, topikaalisessa annostelussa (Budai ym. 2007, Hosny 2009, Mehanna ym. 2009, Hosny 2010a, Hosny 2010b). Liposomiformulaatioiden avulla on pystytty ylläpitämään tehokasta antibioottipitoisuutta riittävän kauan, mikä on olennaista silmätulehduksien hoidossa. Mehannan ja kumppaneiden (2009) suorittamat *in vitro* -kokeet osoittivat, että

liposomeihin kapseloidulla siprofloksasiinilla saavutettiin säädelty lääkeaineen vapautuminen jopa 24 tunnin ajan. Liposomiformulaatio on hyvä vaihtoehto perinteisille silmätipoilte, sillä lääkeaineen pitkittyneen vapautumisen avulla voidaan vähentää annostelukertoja ja siten parantaa potilasmyöntyvyyttä edellyttäen, että valmiste pysyy silmässä riittävän kauan.

Topikaalisesti annosteltavia liposomiformulaatiota on hyödynnetty myös antiviraalisten lääkeaineiden, kuten idoksuridiinin, asikloviirin ja gansikloviirin, kantajina silmän etuosaan. Shenin ja Tun (2007) tutkimuksista kävi ilmi liposomiformulaatioiden parempi sarveiskalvoläpäisevyys sekä biologinen hyötyosuus kuin gansikloviiriliuoksen. Tutkimuksessa selvitettiin liposomiformulaation kykyä kuljettaa gansikloviiriä lasiaiseen topikaalisella annostuksella. *In vitro*- ja *in vivo* -kokeet osoittivat, että liposomaalisen gansikloviirin sarveiskalvoläpäisevyys oli 3,9 -kertainen korkeampi ja että sen biologinen hyötyosuus silmässä oli 1,7 -kertainen suurempi kuin liuoksen (kuva 16). Tulosten perusteella liposomaalinen gansikloviiri on tehokas vaihtoehto hoitamaan sytomegaloviruksen aiheuttamia infektoita silmän sarveis- ja kovakalvolla.



**Kuva 16. Gansikloviirin konsentraatio kammionesteessä 1 ng/ml liposomaalisen gansikloviirin ja gansikloviiriliuoksen annostelun jälkeen kaneilla (muokattu lähteestä Shen ja Tu 2007).**

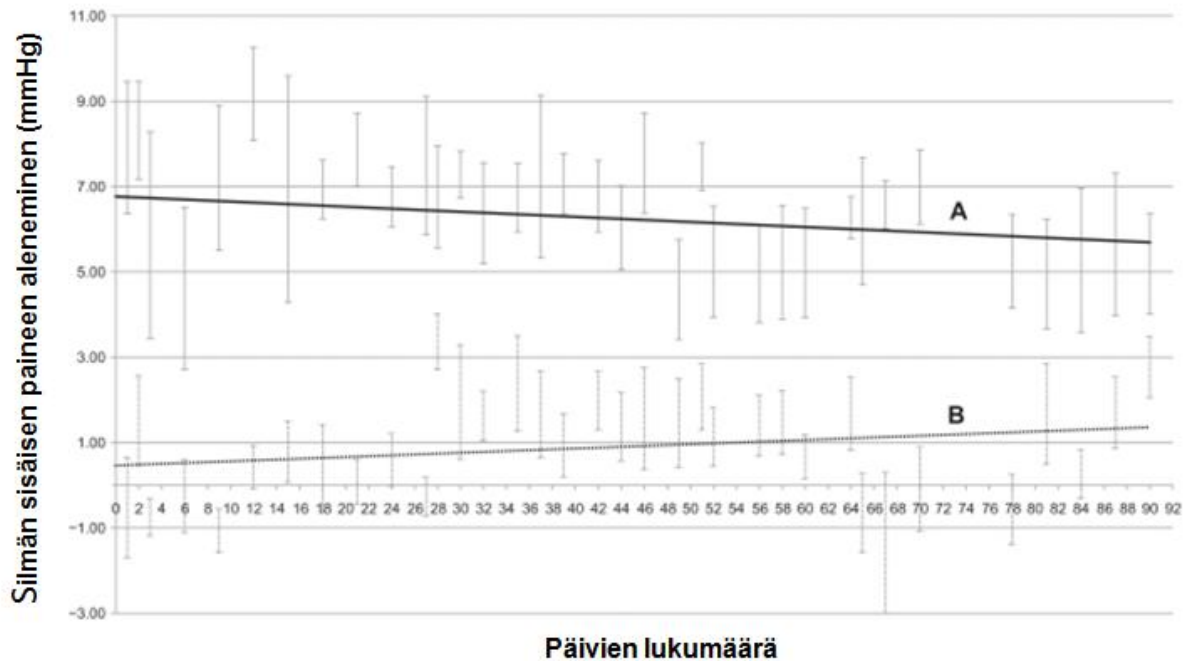
Silmätulehduksien hoidon lisäksi liposomien käyttöä on tutkittu myös glaukooman hoidossa. Glaukooma kuuluu merkittävimpiin sokeutumista aiheuttaviin silmäsairauksiin teollisuusmaissa (Nordmann ym. 2003). Glaukooman perinteinen topikaalinen lääkehoito on kärsinyt alhaisesta hoitomyöntyvyydestä sen alhaisen hyötyosuuden ja lääkeaineiden sivuvaikutuksien vuoksi. Liposomit ovat tarjonneet glaukooman hoitoon erityisiä etuja parantamalla silmänpainetta alentavien lääkeaineiden tehoa, pidentämällä niiden vaikutusaikaa, vähentämällä annostelutiheyttä sekä vähentämällä glaukoomalääkkeiden paikallista toksisuutta silmän pinnassa. Shafaa ja kumppanit (2011a) formuloivat topikaalisesti annosteltavan liposomaalisen timololimaleaatin ja arvioivat sen silmänpainetta alentavaa vaikutusta kanin silmässä. Tulokset osoittivat, että positiivisesti varautuneet liposomit saavuttivat merkittävästi pitkittyneen silmänpainetta alentavan vaikutuksen, joka kesti suunnilleen yhden viikon ajan (160 tuntia). Vastaavanlaisia tuloksia silmänpainetta alentavan vaikutuksen pidentymisestä sekä vaikutuksen tehon parantumisesta on raportoitu myös muiden topikaalisesti annosteltavien glaukoomalääkkeiden, kuten asetatsoliamidin (El-Gazayerly ym. 1997, Hathout ym. 2007), demeklosykliinin (Mishra ym. 2010) ja pilokarpiinin (Monem ym. 2000), liposomifomulaatioiden yhteydessä.

Viime vuosina liposomien käytöstä kuivasilmäisyyden hoidossa on raportoitu hyviä hoitotuloksia (Ebrahim ym. 2005, Craig ym. 2010, Shafaa ym. 2011b). Markkinoille äskettäin tullut liposomisumute, Tearsagain<sup>®</sup>, on uusi annostelumuoto kuivasilmäisyyden hoitoon perinteisten kostutussilmätippojen rinnalle. Sitä annostellaan suihkauttamalla sumutetta suljetuille silmäluomille, josta silmien avauduttua liposomit kulkeutuvat ja levittäytyvät silmän kyynelkalvolle (Sabora Pharma Oy 2012). Craigin ja kumppaneiden (2010) tutkimuksessa osoitettiin, että liposomisuihkeen fosfolipidit paransivat kyynelkalvon stabiilisuutta sekä kyynelkalvon lipidikerroksen paksuutta. Kyynelkalvon uloimman kerroksen, lipidikerroksen, on raportoitu olevan merkittävässä roolissa estämässä kosteuden haihtumista silmästä (Maissa ja Guillon 2010). Liposomien hyödyntämistä on tutkittu myös kuivasilmäisyyden hoidossa käytettävien tippojenkin yhteydessä. Shafaanin tutkimusryhmä (2011b) arvioivat liposomeihin kapseloidun tetrasykliinisilmätippojen tehoa kaneille tehdyssä kuivasilmäisyysmallissa. Tuloksista havaittiin, että liposomit



paransivat merkittävästi tetrasykliinin tehoa huolimatta sen alhaisista pitoisuuksista. Kyynelnesteen laatua mittaavan testin (TBUT) (*engl. Tear Break Up Time*) ja kyynelnesteen vesimäisen osan erityistä mittaavan Schirmerin liuskatestin (STT) tulokset liposomiformulaatioilla osoittivat huomattavaa parantumista verrattuna tetrasykliinitippojen tuloksiin. Havainnot osoittivat, että liposomien avulla voidaan parantaa merkittävästi tetrasykliinin tehoa kuivasilmäisyyden hoidossa ja että liposomit pystyvät tehokkaasti stabiloimaan kyynelkalvon lipidikerroksen.

Topikaalisen annostelun lisäksi liposomiformulaatioita on hyödynnetty myös silmän etuosan sairauksien sidekalvon alaisessa annostelussa. Liposomit mahdollistavat sidekalvon alaisessa injektiossa pitkittyneemmän lääkevaikutuksen sekä lääkeaineen vakaamman ja tasaisemman vapautumisen applikointialueelle (Mishra ym. 2010). Glaukoomalääkkeiden formuloinnissa on ruvettu tutkimaan sidekalvon alaisen annostelun hyödyntämistä yhdessä liposomien kanssa lääkeaineiden terapeuttisen tehon parantamiseksi. Natajanin tutkimusryhmä (2012) tutki sidekalvon alaisesti annostellun liposomaalisen latanoprostin käyttäytymistä kanin silmässä. Tavoitteena oli formuloida liposomaalinen formulaatio, joka mahdollistaisi useammasta viikosta kuukausiin kestävästä pitittyneen lääkeainevaikutuksen yhdellä sidekalvon alaisella injektioilla. Heidän *in vivo* tutkimuksensa osoitti, että liposomaalisen latanoprostin yhdellä sidekalvon alaisella injektioilla pystyttiin alentamaan silmänpainetta tehokkaasti jopa 90 päivän ajan (kuva 17). Liposomaalisen latanoprostin painetta alentava vaikutus oli selvästi suurempi verrattuna kontrollina toimineeseen topikaalisesti annosteltavaan vapaaseen latanoprostiin. Saadut tulokset olivat yhdenmukaiset myös tutkimuksen *in vitro* tulosten kanssa, jotka osoittivat myös hitaan latanoprostin vapautumisen liposomeista.



**Kuva 17. Kanin silmän sisäisen paineen alentumisen vertailu sidekalvon alaisesti annosteltavan liposomaalisen latanoprostin ja topikaalisesti annosteltavan latanoprostin välillä. (A) Liposomaalisen latanoprostin keskiarvo silmän sisäistä painetta alentavasta vaikutuksesta (B) Latanoprostiliuoksen keskiarvo silmän sisäistä painetta alentavasta vaikutuksesta. Erot näiden kahden ryhmän välillä olivat tilastollisesti merkittävät silmän sisäisen paineen arvoissa 90 päivän tutkimusajanjaksolla (muokattu lähteestä Natajanin ym. 2012).**

Glaukooman lisäksi sidekalvon alaisesti annosteltavia liposomiformulaatioita hyödyntämistä tutkittu myös sidekalvon alaisten verenvuotojen hoidossa. Moon ja kumppanit (2006) tutkivat liposomeihin kapseloidun alhaisen molekyyllipainon omaavan hepariinin (LMWH) imeytymisnopeutta sidekalvon alaisen injektion jälkeen sidekalvon alaisten verenvuotojen hoidossa kaneilla. Vapaan LMWH:n käyttöä sidekalvon alaisessa annostelussa rajoittavat mahdollisten systeemisten sekä paikallisten sivuvaikutusten riski. Tulokset osoittivat, että liposomaalinen LMWH paransi sidekalvon alaisten vuotojen liukenemistä. Positiivisesti varautuneet liposomit kapseloivat suurimman määrän LMWH:ta sekä vapauttivat lääkeainetta pitkäaikaisesti mahdollistamalla lääkeaineen pidemmän vaikutusajan sekä korkeamman pitoisuuden kohdealueella. Lisäksi liposomaalisella LMWH:lla havaittiin vähemmän systeemistä sekä silmäimeytymistä kuin vapaalla LMWH:lla. Tämä johtui liposomien isosta koosta, jonka vuoksi ne pysyivät paremmin injektioalueella.

Liposomien avulla voidaan siis vähentää LMWH:n systeemisiä haittavaikutuksia. Vastaanvanlaisia tuloksia liposomiformulaatioiden vaikutuksesta sidekalvon alaisten vuotojen hoitoon saatiin myös Baek ja kumppaneiden tutkimuksesta (2009). He tutkivat liposomeihin kapseloidun streptokinaasin sidekalvonalaisten injektiovaikutusta sidekalvon alaisen vuodon liukenemiseen kaneilla. Sidekalvon alaisesti annostellun liposomaalisen streptokinaasin havaittiin lisäävän sidekalvon alaisen vuodon imeytymistä erityisesti alkuvaiheessa (24-48 h) verrattuna vapaaseen streptokinaasiin. Lisäksi liposomaalista streptokinaasia imeytyi hyvin vähän silmään ja ei lainkaan systeemiseen verenkiertoon.

## **6.2 Silmän takaosan käyttöaiheita**

Silmän takaosan sairaudet, kuten verkko- ja suonikalvontulehdukset, silmänpohjan ikärappeuma ja diabeettinen retinopatia, ovat yleisimpiä syitä näkövammaisuudelle länsimaissa (Amo ja Urtila 2008). Niiden hoitaminen on hyvin haasteellista silmän erilaisten fyysisten sekä toiminnallisten esteiden vuoksi. Näiden ongelmien ratkaisemiseksi onkin useiden silmän takaosan sairauksien hoidossa tutkittu liposomiformulaatioiden käyttöä (taulukko 3).

**Taulukko 3. Liposomiformulaatioiden vaikutuksia silmän takaosan sairauksien hoidossa.**

Lääkeaine	Käyttöaihe	Havainnot	Lähde
Takrolimuusi	Kokeellinen autoimmuuniuveiitti (EAU)	Liposomaalinen takrolimuusi ehkäisi tehokkaasti EAU:n kehittymistä parantamalla lääkeaineen terapeuttista tehoa sekä aikaansaamalla pidennetyn lääkeainevaikutuksen aiheuttamatta sivuvaikutuksia.	Zhang ym. 2010
SU5416*	Suonikalvon uudisverisuonittuminen (CNV)	APRPG*-modifioitujen liposomien yksi intravitreaalinen injektio merkittävästi vähensi CNV:tä	Honda ym. 2011
Vasoaktiivinen intestinaalinen peptidi (VIP)	Silmätulehdukset	Verkkokalvon Müllerin gliasolut ottivat liposomit sisäänsä. Suurin osa liposomeista saavutti imusolmukkeet ja liposomit saivat aikaan hitaamman lääkeaineen vapautumisen ja pitkittyneen vaikutuksen silmässä.	Camelo ym. 2007
Plasmidi DNA:n kationinen liposomikompleksi	Silmäsairaudet	Positiivisesti varautuneet liposomit osoittivat korkeinta transfektioaktiivisuutta silmän kudoksissa.	Kawakami ym. 2004
Foskarneetti	CMV-retiniitti	Foskarneetin farmakokineettiset <i>in vivo</i> tutkimukset osoittivat, että liposomit saavuttivat tasaisen ja kestoaltaan yli 72 tunnin vaikutuksen verkkokalvolla saavuttaen lasiaisessa tarvittavan terapeuttisen pitoisuuden.	Claro ym. 2009

Herpes simplex (HSV) -viruksen antigeenit	HSV-infektiot	Tutkimukset osoittivat, että HSV-antigeenit voidaan kuljettaa silmään liposomien avulla.	Cortesi ym. 2006
Bevasitsumabi	Silmäsairaudet, kuten silmöpohjan ikärappeuma	Liposomit osoittivat suotuisia vaikutuksia pidentämällä bevasitsumabin puoliintumisaikaa lasiaisessa	Abrishami ym. 2009
Fosfodiesteri-oligonukleotidi	AIDS-potilaiden CMV-retiniitti	Liposomiformulaatio pidensi lääkeaineen puoliintumisaikaa verrattuna liuosformulaatioon. Lisäksi liposomiformulaatio suojeli lääkeainetta hajoamiselta.	Bochet ym. 2002
Edaravoni	Verkkokalvon vaurioiden hoito	<i>In vitro</i> koe osoitti, että liposomaalinen edaravoni vähensi happiradikaalien muodostumista sekä niiden aiheuttamaa solukuolemaa valoaltistuksessa vapaaseen edaravoniin verrattuna.	Shimazaki ym. 2011

\*SU5416=3-([2,4-dimetyylipyrrol-5-yyli] metyyliidenyyli)-indoliini-2-ooni),

\*APRPG=angiogeeninen verisuoniin hakeutuva peptidi (Ala-Pro-Arg-Thr-Pro-Gly).

Liposomiformulaatioita on hyödynnetty systeemisesti, intravitreaalisesti sekä paikallisesti silmän takaosaan annettavien lääkeaineiden yhteydessä. Toinen kliinisessä käytössä oleva liposomaalinen silmävalmiste Tearsagain®-liposomisumutteen lisäksi on systeemisesti infuusiona annosteltava verteporfiini (Visudyne®) (Eljarrat-Binstock ym. 2010). Sitä käytetään silmöpohjan ikärappeuman kostean muodon sekä suonikalvoston uudissuonittumisen fotodynaamisessa hoidossa. Visudyne-infuusion jälkeen hoidettavaa silmöpohjan aluetta valotetaan kylmävalolaserilla, mikä aktivoi verteporfiinin. Tämä johtaa uudisverisuonten tukkeutumiseen ja siten ikärappeuman kostean muodon oireiden lievittymiseen (Jaakkola 2002). Liposomiformulaatioita on hyödynnetty tässä, sillä sen on osoitettu parantavan fotodynaamisen hoidon selektiivisyyttä ja siten

tehokkuutta suonikalvon uudissuonittumisen (CNV) hoidossa (Renno ja Miller 2001, Ebrahim ym. 2005).

Intravitreaaliset injektiot ovat tarjonneet tehokkaan tavan kuljettaa lääkeaineet verkkokalvolle (Peyman ym. 2009, Thrimawithana ym. 2010). Intravitreaalinen antotapa kuitenkin vaatii toistuvaa annostelua, mikä voi lisätä lasiaisverenvuotojen, endoftalmiittin ja verkkokalvon irtoamisen mahdollisuutta. Liposomiformulaatiot tarjoavat ratkaisun näiden komplikaatioiden välttämiseksi. Liposomiformulaatioiden hyötyjä intravitreaalisessa annostelussa on esitetty taulukossa 4.

**Taulukko 4. Liposomien hyödyt intravitreaalisessa annostelussa (muokattu lähteestä Bochot ja Fattal 2012).**

---

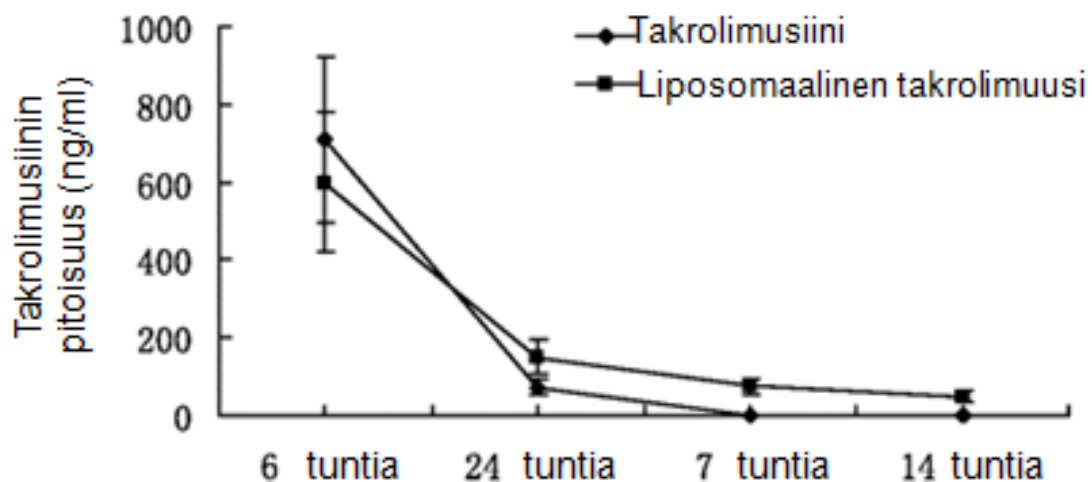
<b>Hyödyt</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pidentää kapseloituneen lääkeaineen vaikutusaikaa silmän takaosassa</li><li>• vähentää lääkeaineen toksisuutta</li><li>• annostelukertojen määrä vähenee</li><li>• lisää kapseloituneen lääkeaineen stabiilisuutta</li><li>• mahdollistaa lääkeaineen kohdentamisen ligandien avulla</li></ul>

---

Lukuisista liposomien hyödyistä johtuen niiden käyttöä silmän takaosan eri sairauksien hoidossa on tutkittu paljon. Liposomit pidentävät intravitreaalisesti annosteltujen lääkeaineiden puoliintumisaikaa, sillä liposomeihin kapseloituneen lääkeaineen poistuminen diffuntoitumalla lasiaisen läpi silmän etuosaan tai fagosytosoituminen verkkokalvon solujen kautta on epätodennäköisempää kuin vapaan lääkeaineen (Gaudana ym. 2010). Guptan tutkimusryhmä (2000) tutki liposomaalisen flukonatsolin farmakokinetiikkaa intravitreaalisen annostelun jälkeen kaneilla. Tutkimuksessa havaittiin, että liposomeihin kapselointi merkittävästi hidasti flukonatsolin puhdistumaa intravitreaalisen annostelun jälkeen. Liposomien puoliintumisaika (23,40 h) oli huomattavasti pidempi kuin flukonatsoliliuoksella (3, 08 h), joten liposomien avulla saavutettiin korkeammat pitoisuudet lasiaisessa.

Abrishami ja kumppanit (2009) tutkivat liposomien vaikutusta silmänpohjan ikärapeuman ja neovaskulaarisen glaukooman hoidossa käytettävään bevasitsumabin farmokokinetiikkaan intravitreaalisen annostelun jälkeen. Bevasitsumabi hajoaa vapaana lääkeaineena hyvin nopeasti, ja siksi tehokkaan pitoisuuden ylläpitämiseksi vaaditaan useita pistokertoja. Tutkimuksessa yritettiin pidentää bevarisumabin liposomiformulaation vaikutusaikaa lisäämällä liposomiformulaatioon kolesterolia. Yhdellä liposomi-injektiolla saavutettiinkin terapeutista annosta viisi kertaa korkeampi bevasitsumabin pitoisuus 42 päivän ajan. Tämä osoitti, että liposomiformulaation intravitreaalisella annostelulla pystytään ylläpitämään bevasitsumabin riittävää terapeutista pitoisuutta jopa yli 6 viikon ajan neovaskulaarisia silmätauteja hoidettaessa. Vastaavia tuloksia liposomiformulaation tehokkuudesta silmänpohjan ikärappeumaa aiheuttavan suonikalvon uudissuonittumisen (CNV) estämisessä on saatu myös Hondan tutkimusryhmältä (2011). He tutkivat angiogeneesi-inhibiittorin, SU5416:n, mahdollista hyödyntämistä silmän suonikalvon uudissuonittumisen hoidossa APRPG-peptidillä modifioituihin liposomeihin kapseloituneena. Tulokset osoittivat, että kahden viikon jälkeen intravitreaalisesta injeksiosta uudisverisuonten määrä oli merkittävästi pienentynyt APRPG-modifioidulla liposomaalisella SU5416:lla hoidettuna.

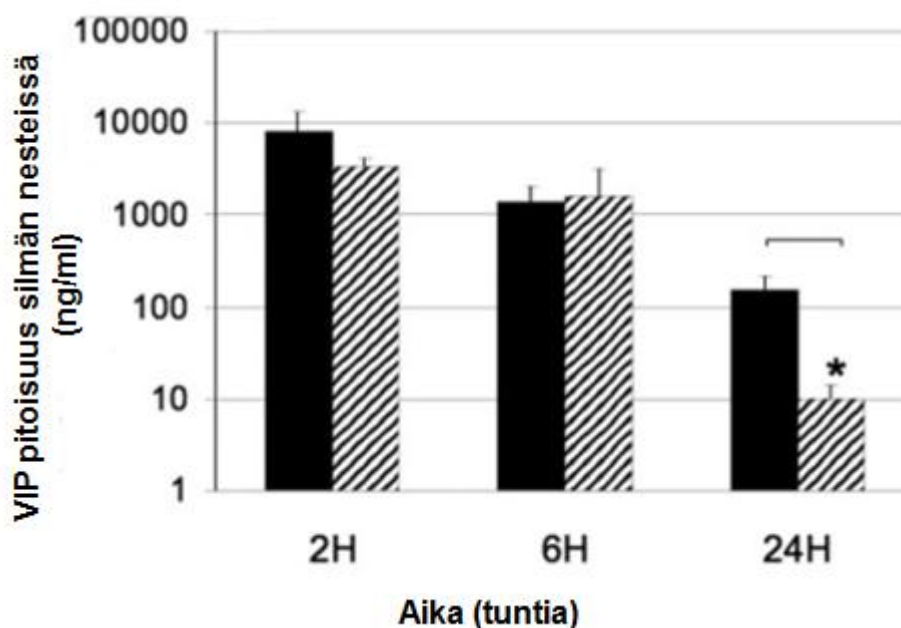
Muita vastaavanlaisia tutkimuksia, joissa liposomit ovat lisänneet lääkeaineen puoliintumisaikaa ja siten mahdollistaneet pitkittyneen vaikutuksen, on havaittu useiden lääkeaineiden kohdalla, kuten flukonatsolilla (Gupta ym. 2000), vasoaktiivisella intestinaalisella peptidillä (VIP) (Lajavardi ym. 2007), foskarneetilla (2009) ja oligonukleotideilla (Bochot ym. 2002). Zhang kollegoineen (2010) tutki liposomien hyödyntämistä kokeellisen autoimmuniuveiitin (*engl. experimental autoimmune uveitis (EAU)*) intravitreaalihoidossa käytettävän takrolimuusin tehokkuuteen. Liposomaalisen takrolimuusilla pystyttiin ylläpitämään 50 ng/ml – pitoisuus kahden viikon ajan lasiaisessa yhden intravitreaalisen annostelun jälkeen (kuva 18). Liposomiformulaation avulla pystyttiin tehokkaasti estämään autoimmuniuveiitin kehittymistä ylläpitämällä tehokasta pitoisuutta tulehdusalueella.



**Kuva 18. Takrolimuusin pitoisuudet lasiaisessa vapaan takrolimuusin ja liposomaalisen takrolimuusin intravitreaalisen injektion jälkeen autoimmuuniuveiittia sairastavissa kaneissa. Arvot ilmaistu keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, ( $n = 4$ ) (muokattu lähteestä Zhang ym. 2010).**

Liposomeja hyödyntämällä voidaan parantaa myös intravitreaalisen annostelun hoitomyöntyvyyttä vähentämällä lääkeaineiden silmän sisäisiä haittavaikutuksia (Bochot ym. 2000). Liposomeihin kapseloitu lääkeaine ei ole niin toksinen kuin vapaa lääkeaine, joka on suorassa kontaktissa silmäkudoksien kanssa. Lajavardin tutkimusryhmä (2007) havaitsi, että liposomiin kapseloiminen suojasi silmäkudoksia vasoaktiivisen intestinaalisen peptidin (VIP) aiheuttamalta tulehdusreaktioilta ja toksisuudelta, joita oli havaittu aikaisemmissa tutkimuksissa. Lisäksi samassa tutkimuksessa havaittiin liposomien kyky suojata niiden sisään kapseloitunutta lääkeainetta ulkopuoliselta ympäristöltä. Tämän suojaavan vaikutuksen vuoksi liposomaalisen VIP:n määrä lasiaisessa oli 24 tunnin jälkeen intravitreaalisesta injektiosta 15 kertaa suurempi kuin VIP-liuoksen intravitreaalisen annostelun jälkeen (kuva 19). Tutkijat olettivat sen johtuvan liposomiformulaation kyvystä vapauttaa VIP:iä tasaisesti pidemmän aikavälin ajan. Vastaavia tuloksia liposomien kyvystä suojata silmäkudoksia lääkeaineiden haitoilta sekä suojata lääkeainetta lasiaisessa tapahtuvalla degeneraatiolla intravitreaalisen annostelun jälkeen on havaittu myös liposomaalisten fosfodiesteri-oligonukleotidien (Bochot ym. 2002), ja amfoterisiini-b:n (Cannon ym. 2003) yhteydessä.

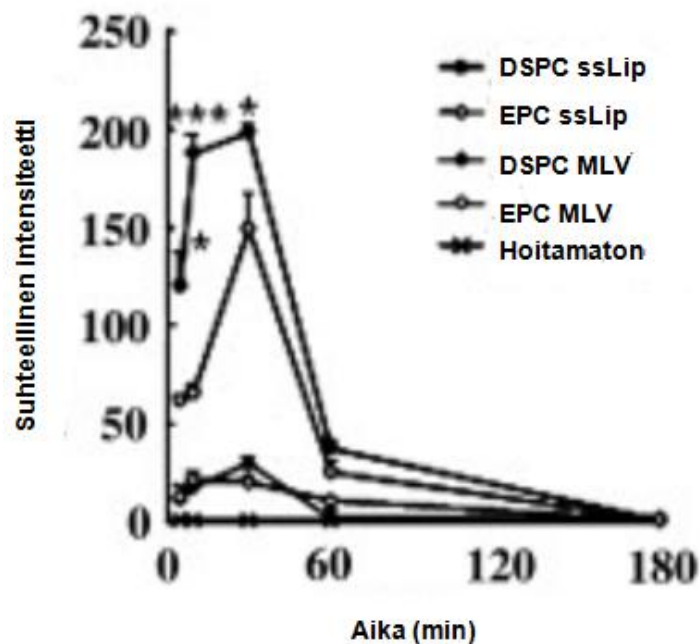




**Kuva 19. Liposomaalisen (musta) sekä vapaan (raidallinen) VIP:n pitoisuudet rotan kammionesteessä sekä lasiaisessa 2, 6, ja 24 tunnin jälkeen intravitreaalisesta injektioista (muokattu lähteestä Lajavardi ym. 2007).**

Silmän takaosan sairauksien hoitamista topikaalisesti annosteltavilla lääkeaineilla on pidetty lähes mahdottomana (Urtti 2006, Eljarrat-Binstock ym. 2010). Pitkä diffuusiomatka silmän pinnasta takaosaan ja silmän fyysiset sekä toiminnalliset esteet vaikeuttavat tehokkaiden lääkeainepitoisuuksien saavuttamista silmän takaosassa paikallisesti silmän pintaan annosteltavilla lääkeaineilla. Vuonna 2009 tapahtui kuitenkin merkittävä läpimurto, sillä Hironaka ja hänen tutkimusryhmänsä raportoivat artikkelissaan, että lääkeaineen kuljetus verkkokalvolle on mahdollista liposomaalisia lääkeainepartikkeleja sisältävillä silmätipoilla (Hironaka ym. 2009). Tulokset osoittivat, että alle mikrometrin kokosiin liposomeihin (ssLip) kapseloidun kumariini-6:n fluoresenssia havaittiin selvästi hiiren verkkokalvolla silmätipa-annostelun jälkeen (kuva 20). Samantapaista fluoresenssia ei sen sijaan havaittu annosteltaessa MLV-liposomeja, mikä osoittaa partikkelikoon merkityksen verkkokalvolle kulkeutumisessa. Lisäksi liposomien jäykkyyden havaittiin vaikuttavan kumariini-6:n verkkokalvolle kulkeutumisen tehokkuuteen, sillä jäykemmästä L- $\alpha$ -distearoyylifosfatidyylikoliinista valmistetut liposomit fluoresoivat verkkokalvolla

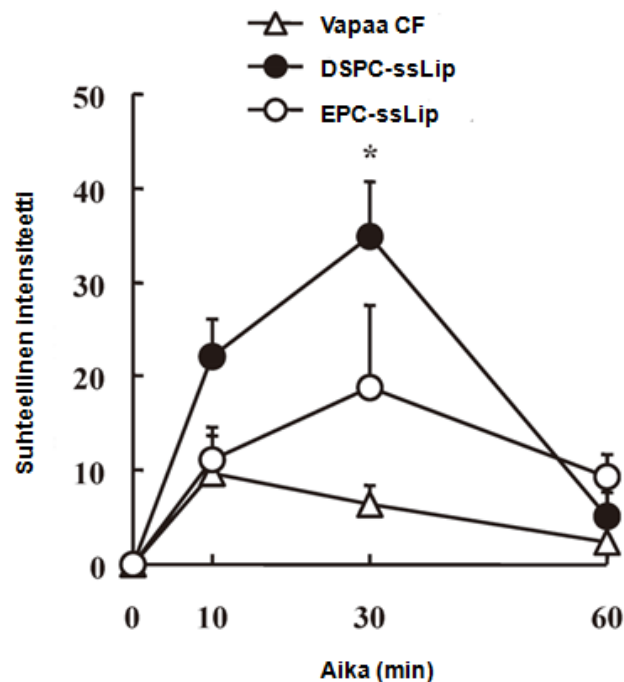
enemmän kuin kananmunan fosfatidyylikoliinista valmistetut liposomit (kuva 20). Vastaavanlaisia tuloksia nanokantajan partikkelikoon ja jäykkyyden vaikutuksesta verkkokalvokulkeutumiseen havaittiin myös Inokuchin ja kumppaneiden (2010) tutkimuksessa. He havainnollistavat erilaisten kolloidaalisten nanokantajien kautta fysikokemiallisten ominaisuuksien merkityksen hydrofobisen lääkeaineen verkkokalvokulkeutumisen tehokkuuteen topikaalisen annostelun jälkeen hiirillä, kaneilla ja apinoilla. Tuloksista nähtiin, että ssLip-liposomit kulkeutuivat verkkokalvolle selvästi parhaiten muihin liposomityyppeihin sekä nanokantajasysteemeihin (polystyreenipartikkeleihin, lipidiemulsioihin) verrattuna.



**Kuva 20.** Kumuloituneen fluoresenssin intensiteetin muutokset ajan suhteen silmätipa-annostelun jälkeen verkkokalvolla (keskiarvo  $\pm$  keskihajonta,  $n=3$ ). \*  $p<0,05$ ; \*\*\*  $p<0,001$  tilastollisesti merkitsevä ero EPC-ssLip-liposomeihin. Kuvassa: DSPC ssLip/DSPC MLV= L- $\alpha$ -distearoyylifosfatidyylikoliinista valmistetut ssLip-/MLV-liposomit, EPC ssLip/EPC MLV= kananmunan fosfatidyylikoliinista valmistetut ssLip-/MLV-liposomit (muokattu lähteestä Hironaka ym. 2009).

SsLip-liposomien osoitettu kyky mahdollistaa silmän takaosan sairauksien hoito ei-invasiivisella annostelulla herätti tutkimusryhmien halun tutkia asiaa lisää. Hironaka

kollegoineen (2011) osoittivat tutkimuksessaan, että ssLip-liposomit soveltuvat myös hydrofiilisten lääkeaineiden kuljettamiseen verkkokalvolle. He vertasivat hiirille tehdyssä tutkimuksessa L- $\alpha$ - distearoyylifosfatidyylikoliinista ja kananmunan fosfatidyylikoliinista valmistettuihin ssLip-liposomeihin kapseloituneen 5(6)-karboksyylifluoreseiinin verkkokalvolle kulkeutumista vapaan 5(6)-karboksyylifluoreseiinin kulkeutumiseen topikaalisen annostelun jälkeen. Tulokset osoittivat, että 30 minuutin jälkeen silmätippa-annostelusta molempiin ssLip-liposomeihin kapseloituneen karboksyylifluoreseiinin fluoresenssia havaittiin hiiren verkkokalvolla huomattavasti selkeämmin kuin vapaan karboksyylifluoreseiinin (kuva 21). Tuloksista nähtiin myös aikaisemmissakin tutkimuksissa havaittu liposomien jäykkyyden merkitys verkkokalvolle kulkeutumisen kannalta, sillä jäykemmästä L- $\alpha$ -distearoyylifosfatidyylikoliinista valmistettujen ssLip-liposomien (DSPC-ssLip) kulkeutuminen verkkokalvolle oli tehokkaampaa kuin kananmunan fosfatidyylikoliinista valmistettujen ssLip-liposomien (EPC-ssLip). Tutkittavien aineiden fluoresenssin merkittävän heikkenemisen takana 60 minuutin jälkeen silmätippa-annostelusta uskotaan olevan suonikalvon verenkierto, joka puhdistaa verkkokalvoa lääkeaineista.



**Kuva 21.** Verkkokalvolle kumuloituneen karboksyylifluoreseiinin fluoresenssin intensiteetin muutokset ajan suhteen paikallisesti annosteltun silmätippojen jälkeen vapaalla karboksyylifluoreseiinilla (CF), L- $\alpha$ -

**distearoyylifosfatidyylikoliinista valmistetuilla ssLip-liposomeilla (DSPC-ssLip) ja kananmunan fosfatidyylikoliinista valmistetuilla ssLip-liposomeilla (EPC-ssLip). Arvot ilmaistu keskiarvo  $\pm$  keskihajonta, ( $n = 5$  tai  $6$ ),  $*p < 0,05$  verrattuna vapaaseen karboksyylifluoreseiinihoitoon (muokattu lähteestä Hironaka ym. 2011).**

Viimeisimmässä ssLip-liposomeihin liittyvässä tutkimuksessa ssLip-liposomaalisten silmätippojen hyödyntämistä on tutkittu valolla indusoitujen verkkokalvovaurioiden hoidossa hiirillä (Shimazaki ym. 2011). Tutkimuksissa arvioitiin, pystytäänkö ssLip-liposomien avulla aikaisemmin systeemisesti ja intravitreaalisesti annosteltua edaravonia kuljettamaan verkkokalvolle topikaalisella annostelulla niin, että se suojaisi verkkokalvoa valon indusoimilta vaurioilta. Shimazakin tutkimusryhmä (2011) havaitsi, että silmätippana annostellut edaravoni-ssLip –liposomit ehkäisivät sekä a- että b-aaltojen amplitudien alentumista silmän verkkokalvon toimintaa kuvaavissa elektroretinogrammeissa (ERG), mikä on tyypillistä verkkokalvon vaurioituessa. Tämä tulos sekä histologisten kokeiden hyvät tulokset osoittavat edaravonin liposomaalisilla silmätippoilla saavutetaan fotoreseptorien rappeutumista ehkäisevä vaikutus hiirillä. Lisäksi *in vitro* -kokeiden tulokset osoittivat, että ssLip-edaravoni vähensi reaktiivisten happiradikaalien (ROS) muodostumista ja solukuolemaa valoaltistuksessa enemmän kuin vapaa edaravoni.

## 7 LIPOSOMIFORMULAATIOIDEN ONGELMIA

Viimeisten vuosikymmenten aikana liposomitekniologian käyttö silmälääkinnässä on herättänyt suurta kiinnostusta biologisen hyötyosuuden parantajana, lääkeaineen kuljettajana sekä pitkittyneemmän lääkeainevaikutuksen aikaansaajana (Mishra ym. 2010). Syynä tälle ovat liposomiformulaatioiden hyvät ominaisuudet, kuten biohajoavaisuus, alhainen toksisuus, amfifiilisyytys, sekä fysikokemiallisien ominaisuuksien monipuolisuus (Kaur ym. 2004). Liposomiformulaatioiden potentiaalisuudesta huolimatta toistaiseksi vain muutamia liposomitekniologiaan perustuvia silmävalmisteita on hyväksytty kliiniseen käyttöön. Tämä on seurausta useista syistä, kuten liposomiformulaatioiden stabiilisuusongelmista, sterilointiongelmissa sekä liposomien valmistukseen liittyvistä ongelmista (Sharma ja Sharma 1997, Mozafari 2005).

### 7.1 Stabiilisuus

Liposomiformulaatioiden merkittävimpana ongelmana on niiden epästabiilisuus (Sharma ja Sharma 1997, Jesorka ja Orwar 2008, Zhang ym. 2009). Stabiilisuusongelmien vuoksi liposomivalmisteiden käyttöajat ovat usein lyhyitä.

Liposomit ovat alttiita sekä kemialliselle että fysikaaliselle epästabiilisuudelle. Kemiallinen epästabiilisuus on seurausta fosfolipidien hydrolyysistä sekä hapettumisesta (Mohammed ym 2006). Molemmat reaktiot aiheuttavat liposomien rakenteeseen muutoksia, joista tyypillisin on liposomin kaksoiskalvon läpäisevyyden lisääntyminen. Fosfolipidien hapettumisista aiheuttavat yleensä valmistuksessa käytetty säteilytys ja sonikaatio, tai erityiset oksidantit ja metalli-ionit. Erityisen herkkiä hapettumiselle ovat tyydyttymättömiä rasvahappoja sisältävät fosfolipidit. Fosfolipidien hydrolyysi sen sijaan on yleensä happojen tai emästen katalysoima reaktio. Sen aikana fosfolipidit hydrolysoituvat vapaiksi rasvahapoiksi ja lysofosfolipideiksi, jotka lisäävät liposomien permeabiliteettiä (Vermuri ja Rhodes 1995).

Liposomit ovat alttiita myös fysikaaliselle epästabiilisuudelle (Sharma ja Sharma 1997, Mohammed ym. 2006). Liposomien aggregaatio, fuusioituminen, saostuminen sekä kapseloituneen lääkeaineen menetys on tyypillisimpiä fysikaalisen epästabiilisuuden aiheuttajia. Kyseiset fysikaaliset muutokset on usein seurausta mm. lämmityksen ja pakastuksen aiheuttamasta liposomin kaksoiskalvon vioittumisesta.

Liposomien stabiilisuuden parantamiseksi on tutkittu useiden eri menetelmien, kuten pakastamisen, kylmäkuivauksen sekä sumukuivauksen, käyttöä (Zhang ym. 2009, Chen ym. 2010, El-Nesr ym. 2010). Näistä menetelmistä kylmäkuivaus on eniten käytetty menetelmä liposomien käyttöajan pidentämiseksi. Zhang ym. (2009) raportoivat, että kylmäkuivattujen sytokromi c:tä sisältävien liposomien stabiilisuus oli parempi kuin normaalien liposomien ja että ne suojasivat lääkeainetta ainakin 12 kuukauden ajan. Kylmäkuivauksen eli lyofiilisaation aikana liposomiformulaatiosta poistetaan vesi fosfolipidien hydrolyysin estämiseksi sekä huokoisen kuivatun tuotteen aikaansaamiseksi. Kylmäkuivattu liposomiformulaatio omaa alhaisen molekulaarisen liikehdinnän ja on siten kemiallisesti ja fysikaalisesti stabiilimpi. Kylmäkuivauksen jäädytys- ja kuivausvaiheet voivat kuitenkin aiheuttaa rakenteellisia tai funktionaalisia vaurioita liposomiin (El-Nesr ym. 2009, Zhang ym. 2009, Chen ym. 2010). Jäädytyksen aikana liposomien kaksoiskalvo voi vahingoittua, kun taas kuivausvaihe voi aiheuttaa liposomien aggregoitumista sekä fuusioitumista. Näiden haitallisten ilmiöiden estämiseksi kylmäkuivattaviin liposomiformulaatioihin lisätään apuaineiksi kryoprotektantteja, esim. trehaloosia ja sakkaroosia, jotka suojaavat kuivattavaa valmistetta kyseisiltä haitallisilta ilmiöiltä.

## **7.2 Sterilointi**

Sterilointi kuuluu tärkeimpiin liposomien valmistusvaiheisiin valmistettaessa liposomiformulaatioita ihmisten ja eläinten käyttöön (Sharma ja Sharma 1997, Mozafari 2005, Mohammed ym. 2006). Koska silmä on herkkä elin, silmälääkinnässä erityisen tärkeää huolehtia, että silmään aplikoitavat tuotteet ovat vapaita taudinaiheuttajista. Liposomiformulaatioiden sterilointi on kuitenkin ongelmallista, sillä

suurin osa sterilointimenetelmistä, kuten autoklavointi, eivät sovellu niille. Liposomit ovat herkkiä kemiallisille ja fysikaalisille käsittelyille, erityisesti lämmitykselle, säteilytykselle ja kemiallisille sterilointiaineille, koska ne tuhoavat liposomien rakenteen vapauttaen näin kapseloitavan materiaalin liposomista. Ainoana sterilointimenetelmänä liposomiformulaatioille onkin pidetty niiden suodattamista steriiliin 0,22 µm membraanisuodattimen läpi. Suodatus kuitenkin soveltuu kooltaan vain pienten liposomien (halkaisijaltaan enintään 300 nm) sterilointiin, eikä sen avulla pystytä myöskään poistamaan suurinta osaa viruksista (Tardi ym. 2001). Lisäksi suodattaminen on hidasta eikä siten sovellu suurien eräkokojen sterilointimenetelmäksi. Liposomiformulaatioiden vaihtoehtoisiin sterilointimenetelmiin kuuluu mm. gamma-säteilytys (Zuidam ym. 1996, Mohammed ym. 2006). Sen soveltuvuus rajoittuu kuitenkin vain kylmäkuivattujen liposomivalmisteiden sterilointiin, sillä nestemäisiä liposomiformulaatioita säteilyttäessä muodostuu hydroksyyliiradikaaleja, jotka aiheuttavat fosfolipidien voimakasta kemiallista hajoamista. Lämpöherkkyydestä huolimatta liposomiformulaatioiden sterilointiin on tutkitusti soveltunut myös lämmitys (Tardi ym. 2001, Mozafari 2005). Kikuchi ja kumppanit (1990) tekivät läpimurron raportoidessaan mahdollisuudesta steriloida liposomit lämpösteriloinnilla (121 °C, 20 min) ilman liposomirakenteen tuhoutumista. Lämpökäsittelyä onkin nykyään hyödynnetty useissa uudemmissa liposomien valmistusmenetelmissä (Meure ym. 2008).

### **7.3 Valmistukseen liittyvät ongelmat**

Kolmantena liposomiformulaatioiden laajempaa käyttöönottoa rajoittavana tekijänä on niiden valmistukseen liittyvät ongelmakohdat. Näitä ovat muun muassa valmistuksessa käytetyt haastavat olosuhteet, liposomien alhaiset kapselointitehokkuudet, ongelmat suurempien eräkokojen valmistuksessa, valmistuksen kalleus sekä erien välinen vaihtelu (batch to batch) (Sharma ja Sharma 1997, Mozafari 2005, Meure ym. 2009).

Liposomien valmistusmenetelmien suurimpana ongelmana ovat vaativat valmistusolosuhteet (Mozafari 2005, Meure ym. 2008). Suurin osa liposomien

perinteisistä valmistusmenetelmistä ei sovellu herkkien aineiden kapselointiin. Valmistuksen aikana kapseloitavat aineet altistuvat haitallisille kemikaaleille, kuten haihtuville orgaanisille liuottimille (*engl. volatile organic solvents*) ja puhdistusaineille; sekä kovalle mekaaniselle rasitukselle, kuten sonikaatiolle, korkealle paineelle, ja high shear -homogenisoinnille, jotka voivat denaturoida fosfolipejä sekä lääkeaineita (Meure ym. 2009). Merkittävänä haittapuolena on erityisesti orgaanisten liuottimien käyttö liposomien valmistuksessa. Nämä haihtuvat orgaaniset liuottimet, kuten eetteri ja metanoli, ovat haitallisia sekä ympäristölle että ihmisen terveydelle. Ne voivat muuttaa kapseloitavan lääkeaineen rakennetta ja niiden jäänteet lopputuotteessa voivat aiheuttaa toksisuutta sekä huonontaa liposomien stabiilisuutta (Cortesi ym. 1999, Mozafari 2005). Orgaanisten liuottimien poistamista varten on kehitetty useita menetelmiä, kuten dialyysi, geelifiltraatio ja vakuumi. Silti jopa näiden eri käsittelyjen jälkeenkin valmisteissa on havaittu pieniä jäännöksiä orgaanisista liuottimista. Lisäksi nämä orgaanisen liuottimien poistamiseen käytettävät käsittelyt lisäävät liposomien valmistuksen monimutkaisuutta sekä kustannuksia (Meure ym. 2008).

Liposomien ideaalinen valmistusmenetelmä olisi nopea, yksinkertainen, halpa ja yksivaiheinen prosessi, joka tuottaisi stabiileja ja korkean kapselointitehokkuuden omaavia liposomeja suurella tuotantomittakaavalla (Mozafari 2005). Monet liposomien valmistustavoista eivät kuitenkaan täytä näitä tavoitteita. Useat liposomien perinteiset valmistusmenetelmät ovat melko monimutkaisia sekä hitaita prosesseja. Monien puutteena on myös niiden avulla valmistettujen liposomien huono kapselointitehokkuus. Liposomien perinteisistä valmistusmenetelmistä vain muutamat menetelmät, kuten käänteisfaasin haihdutus -menetelmä sekä MLV-liposomien jäädytys-sulatusmenetelmä, saavuttavat kohtuullisen hyvän kapselointitehokkuuden (30-65%). Merkittävänä puutteena näillä perinteisillä valmistusmenetelmillä on myös niiden valmistusprosessien monivaiheisuus, jonka vuoksi liposomien valmistusmäärän kasvattaminen massatuotannoksi niiden avulla on melko vaikeaa sekä kallista (Meure ym. 2009).

Liposomien valmistukseen liittyvien ongelmien ratkaisemiksi onkin viime vuosien aikana kehitelty uusia, kehittyneempiä valmistusmenetelmiä (Meure ym 2008). Uudet valmistusmenetelmät eroavat perinteisistä liposomien valmistustavoista mahdollistamalla liposomien valmistamisen ilman orgaanisia liuottimia. Lisäksi ne



tarjoavat usein nopean, yksivaiheisen, steriilit olosuhteet omaavan prosessin, joka tuottaa stabiileja, kooltaan homogeenisia ja korkean kapselointitehokkuuden omaavia liposomeja. Merkittävimpinä etuina näillä kehittyneimmillä valmistusmenetelmillä ovat kuitenkin liposomien valmistukseen kuluvan ajan huomattava pieneminen sekä bulkvalmisteiden yksinkertainen valmistaminen (Meure ym. 2009). Tällaisia kehittyneempiä valmistustapoja ovat mm. lämmitys-menetelmä (*engl. heating method*) (Mozafari ym 2002) ja mikrofluidistinen kanava –menetelmä (*engl. microfluidic channel method*) (Jahn ym 2007). Lupaavia valmistusmenetelmiä ovat myös erilaiset kaasumenetelmät, kuten ISCRPE (*engl. the improved supercritical reverse phase evaporation*) ja DESAM (*engl. the depressurisation of expanded solution into aqueous media*) (Otake ym. 2006, Meure ym. 2009). Ne perustuvat superkriittisen hiilidioksidin (scCO<sub>2</sub>) hyödyntämiseen korkean kapselointitehokkuuden omaavien liposomien valmistuksessa (Otake ym. 2001). Superkriittisen hiilidioksidin avulla orgaaniset liuottimet voidaan korvata ympäristöystävällisesti, sillä hiilidioksidi on myrkytön, syttymätön sekä hinnaltaan edullinen kaasu.

## 8 YHTEENVETO

Silmä toimii suurena haasteena lääkeaineiden silmäimeytymisen kannalta. Silmää suojelevat erilaiset anatomiset sekä patofysiologiset esteet, jotka tekevät silmän lähes läpäisemättömäksi vierasaineille ja vaikeuttavat siten lääkeaineiden pääsyn silmään. Silmälääkinnän merkittävimpänä ongelmana onkin perinteisten silmävalmisteiden alhainen hyötyosuus silmässä.

Viimeisen vuosikymmenen ajan on tutkittu erilaisten lääkeaineen kantajasysteemien hyödyntämistä perinteisten silmälääkeformulaatioiden puutteiden ratkaisemisessa. Eräs näistä tutkituista kantajasysteemeistä on ollut liposomit. Liposomit ovat biologisesti yhteensopivia ja biohajoavia nanokantajia, jotka voivat kapseloida sisäänsä sekä hydrofiilisiä ja -fobisia lääkeaineita. Liposomien pintavarausta, partikkelikokoa ja koostumusta muuntelemalla niitä voidaan myös muokata tarkoitukseen sopivaksi. Niiden ainutlaatuisten ominaisuuksien vuoksi liposomit ovatkin osoittautuneet tehokkaaksi keinoksi parantaa sekä silmän etuosaan että takaosaan annosteltavien lääkeaineiden hyötyosuutta sekä tehokkuutta. Silmän etuosassa liposomien on havaittu parantavan lääkeaineen silmäimeytymistä pidentämällä lääkeaineen vaikutusaikaa sekä lisäämällä lääkeaineen kulkeutumista sarveiskalvon läpi. Silmän takaosassa liposomit pidentävät lääkeaineen puoliintumisaikaa sekä parantavat verkkokalvolle kohdennettua lääkeaineen kuljetusta.

Liposomiformulaatioiden potentiaalisuudesta huolimatta toistaiseksi vain muutamia liposomiteknologiaan perustuvia silmävalmisteita on hyväksytty ihmisten käytettäväksi. Liposomien käyttöä silmälääkinnässä ovat rajoittaneet liposomiformulaatioihin liittyvät stabiilisuus- ja steriilisyysongelmat sekä niiden valmistukseen liittyvät ongelmat. Liposomit ovat alttiita sekä kemialliselle että fysikaaliselle epästabiilisuudelle, minkä vuoksi liposomivalmisteiden käyttöajat ovat usein alhaiset. Lisäksi ne ovat herkkiä kemiallisille ja fysikaalisella käsittelyille, joten liposomien sterilointi on hyvin haasteellista. Merkittävin liposomiformulaatioiden laajempaa käyttöönottoa rajoittavana tekijänä on kuitenkin niiden valmistukseen liittyvät ongelmakohdat, kuten valmistuksen haastavat olosuhteet, liposomien

alhaiset kapselointitehokkuudet, ongelmat suurempien eräkokojen valmistuksessa sekä valmistuksen kalleus.

Tulevaisuuden haasteena on liposomiformulaatioihin liittyvien ongelmien ratkaiseminen. Tämä mahdollistaisi liposomeille todennäköisesti merkittävämmän aseman silmävalmisteiden formuloinnissa sekä myös siten parantaisi yleisesti silmäsairauksien hoidon tehokkuutta liposomien tarjoamien hyötyjen vaikutuksesta.

## **II KOKEELINEN OSA:**

**TRANS-RESVERATROLIN JA PINOSYLVININ SUOJAAVAT  
VAIKUTUKSET OKSIDATIIVISELLE STRESSILLE  
HYDROKINONIALTISTUKSESSA ARPE-SOLUISSA**

**PROTECTIVE EFFECTS OF TRANS-RESVERATROL AND  
PINOSYLVIN ON THE HYDROQUINONE-INDUCED OXIDATIVE  
STRESS IN ARPE CELLS**

## 9. TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Silmänpohjan ikärappeuma on verkkokalvon tarkan näkemisen alueelle, makulaan, kohdistuva sairaus (Kinnunen ym. 2011). Se on yleisin näkövammaisuutta aiheuttava sairaus teollistuneissa maissa. Arvioiden mukaan ikärappeumaa sairastavia on maailmassa noin 50 miljoonaa, joista noin kolmannes luokitellaan näkövammaisiksi (Kaarniranta ym. 2009). Lisäksi sairastuneiden määrän ennustetaan kasvavan merkittävästi seuraavien vuosikymmenien aikana eliniän pitenemisen myötä (Beatty ym. 2000).

Ikärappeumaa on olemassa kahta eri muotoa, kuivaa ja kosteaa muotoa (Ambati ym. 2003). Verkkokalvon pigmentin epätasaisuus ja RPE-solujen ympärille kertyvät kasaumat, drusenit, ovat ensimmäisiä merkkejä rappeumamuutoksia silmänpohjassa (Kaarniranta ym. 2009). Kuiva eli atrofinen muoto on yleisin, sillä noin 80 % ikärappeumapotilaista sairastaa sitä. Kuivassa muodossa drusenit ovat kovia tai pehmeitä, eikä verkkokalvon uudisverisuonten muodostumista tavata. Kuivaan rappeumaan ei tunneta vielääkään tehokasta hoitoa. Kosteassa eli eksudatiivisessa muodossa sen sijaan silmän suonikalvosta kasvaa hauraita, kudosnestettä ja verta tihkuttavia uudisverisuonia verkkokalvolle, jotka aiheuttavat verkkokalvon turpoamista sekä oireiden nopean etenemisen (Fine ym. 2000). Kosteaa ikärappeumamuotoa heikentää nopeasti ja pysyvästi näöntarkkuutta, jos ei sitä hoideta. Kostean rappeuman hoidon avulla pyritään estämään rappeuman etenemistä. Hoitomuotoina ovat polttolaser- tai valoaktivaatiohoidot, joiden avulla pyritään tuhoamaan uudisverisuonitus. Kostean rappeuman hoidossa erittäin tärkeää on kuitenkin riittävän varhainen taudin toteaminen ja siten hoitojen aloittaminen riittävän ajoissa.

Silmänpohjan ikärappeuman kehittymismekanismit vuosikymmenien tutkimuksien jälkeenkin ovat vielä epäselviä (Sheu ym. 2010a). Yleisesti tiedetään kuitenkin, että silmänpohjan ikärappeuman aiheuttama näön heikkeneminen ja jopa näön menetys on seurausta verkkokalvon fotoreseptorien tuhoutumisesta, mutta patogeenin aikaisempaan vaiheeseen kuuluu verkkokalvon pigmenttiepiteelisolujen (RPE) rappeutuminen eli degeneraatio. RPE-soluilla on tärkeitä tehtäviä valoistinsolujen

vitaliteetin säilyttämisessä. Ne huolehtivat hapen ja ravintoaineiden välityksestä valoistinsoluille, ulkosegmentin aineosien fagosytoosista sekä mm. myös oikean ionitasapainon ylläpitämisestä valoistisolujen ympärillä. RPE-solujen kuolemiselle ei ole vielä tarkkaa syytä, mutta tutkimuksissa on osoitettu RPE-solujen kuolevan apoptoosin kautta (Dunaief ym. 2002).

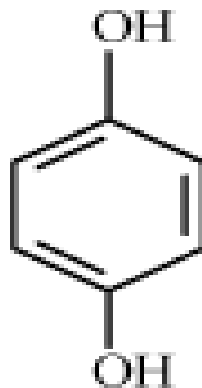
Nykykäsityksen mukaan silmänpohjan ikärappeuman taustalla on mahdollisesti krooninen oksidatiivinen stressi, joka aiheuttaa RPE-solujen vahingoittumista ja kuolemaa (Cai ym. 2000, Liang ja Godley 2003). Oksidatiivisella stressillä tarkoitetaan reaktiivisten happiradikaalien (ROS), kuten superoksidianionin ja hydroksyyli-radikaalin, aiheuttamia soluvauriota (Kinnunen ym. 2011, Beatty 2000). Näitä yhdisteitä muodostuu solujen metabolian ja fotokemiallisten reaktioiden sivutuotteina, ja niiden kohteena ovat monityydyttymättömiä rasvahappoja sisältävät solukalvot. Silmän verkkokalvo on erityisen altis oksidatiiviselle stressille monestakin syystä. Verkkokalvo on yksi eniten happea kuluttava kudosis elimistössä. Valoistinsolujen ulkosegmentin membraanit koostuvat hapettumiselle herkistä monityydyttymättömistä rasvahapoista, kuten dokosaheksaanihaposta (DHA), jonka hapettumisen on osoitettu olevan yksi merkittävistä syistä RPE-solujen vaurioitumiselle ja rappeutumiselle. Verkkokalvo altistuu säteilylle, joka indusoi yleisesti happiradikaalien muodostumista. Vapaita radikaaleja muodostuu myös, kun RPE-solut fagosytosoivat ulkosegmentin aineosia (Beatty ym. 2000, Ambati ym. 2003, Hollyfield ym. 2008). Näiden lisäksi ikääntymisen myötä RPE-soluihin alkaa kertyä runsaasti lipofuskiinia, joka on autofluoreisoiva rasva-alkuaineaggregaattia. Lipofuskiini häiritsee RPE-solujen toimintaa vaurioittamalla lysosomien toimintaa, indusoimalla lipidien peroksidaasia ja heikentämällä RPE-solujen fagosytoosikykyä (Kinnunen ym. 2011). Nämä nopeuttavat RPE-solujen degeneraatiota sekä niiden kuolemista. Terveessä verkkokalvossa RPE-solut pystyisivät selviytymään edellä mainituista haasteista, mutta ikääntymisen myötä oksidatiivinen stressikuormitus on kasvanut suureksi (Kaarniranta ym. 2009). Lisäksi silmänpohjan ikärappeuman aikana on havaittu elimistön antioksidanttien, jotka suojaavat elimistön makromolekyylejä oksidaatiolta, seerumipitoisuuksien olevan alhaisemmat kuin kontrolliryhmällä (Yildirim ym 2011). Tämä yhdessä lisääntyneen

oksidatiivisen stressikuormituksen kanssa johtavat RPE-solujen degeneraatioon ja näkökyvyn heikkenemiseen.

Oksidatiivisen stressin lisäksi monet tutkimukset ovat osoittaneet ikärappeuman taustalla olevan myös kroonisen tulehduksen mahdollisuus (Kaarniranta ym. 2009). Tulehdusta aiheuttavat RPE-solujen tyvikalvon ja Bruchin kalvon väliin kasaantuvat haitalliset drusenit, joiden suuri koko ja määrä korreloivat ikärappeuman synnyn kanssa (Mullins ym. 2000, Kaarniranta ym. 2003). Drusenien muodostumisen taustalla on RPE-solujen heikentynyt kyky poistaa proteiiniagregaatteja RPE-solujen basolateraalipuolelta (Kaarniranta ym. 2010).

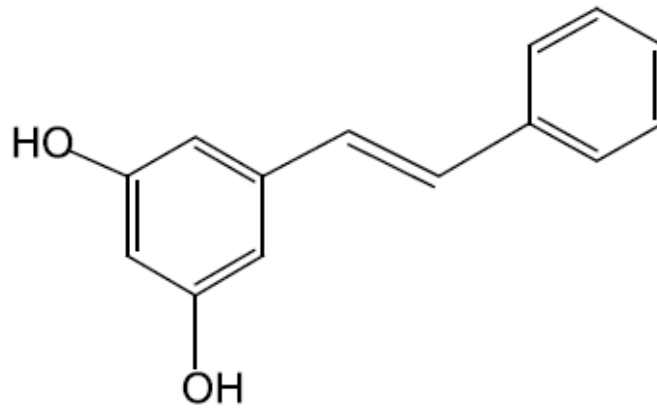
Silmänpohjan ikärappeuma on monimuotoinen sairaus, johon vaikuttavat niin geneettiset tekijät kuin ympäristötekijät (Kinnunen ym. 2011). Merkittävin ympäristöllinen riskitekijä silmänpohjan ikärappeuman kehittymiselle on tupakointi, sillä tupakoinnin tiedetään lisäävän RPE-solujen oksidatiivista stressitakkaa ja siten nopeuttavan soluvaurion progressiota (Thornton ym. 2005, Bertram ym. 2009, Cano ym. 2010). Monet tutkimukset ovat osoittaneet tupakoinnin vaikuttavan merkittävästi ikärappeuman puhkeamiseen sekä sen etenemiseen aiheuttamalla oksidatiivisia vauriota RPE-soluihin (Clemons ym. 2005, Thornton ym. 2005, Klein ym. 2008). Tupakoivilla henkilöillä on 2-3 kertainen riski sairastua silmänpohjan ikärappeumaan kuin tupakoimattomilla (Thornton ym. 2005, Khan ym. 2006, Klein ym. 2008). Lisäksi poltettujen savukkeiden määrän on havaittu korreloivan ikärappeuman esiintyvyyteen (Vingerling ym. 1996). Tupakansavu sisältää yhteensä lähes 5000 erilaista kemikaalia, joista useiden on osoitettu aiheuttavan oksidatiivista stressiä RPE-soluissa (Jia ym. 2007, Bertram ym. 2009, Cano ym. 2010). Jokainen tupakanhenkäys sisältää myös  $10^{15}$  vapaata radikaalia, jotka aiheuttavat lipidien ja proteiinien hapettumista (Cano ym. 2010). Yleisimpänä yhdisteenä tupakansavussa on hydrokinoni (HQ) (kuva 22) (Alcazar ym. 2007, Pons ym. 2010). Sitä tavataan tupakansavun lisäksi myös muun muassa prosessoidussa ruoassa, ilmakehän saasteena sekä muoviastioissa. Monissa tutkimuksissa on osoitettu hydrokinonin aiheuttavan oksidatiivista vauriota RPE-soluihin *in vitro* ja *in vivo* (Alcazar ym. 2007, Pons ym. 2010, Pons ja Castano 2011). Erikoistyössäni hydrokinonilla indusoiitiin ARPE-19-soluille oksidatiivista stressiä.

Silmänpohjan ikärappeuman hoito on tällä hetkellä hyvin rajallista. Tästä syystä on viime aikoina ruvettu tutkimaan keinoja ehkäistä ikärappeumaa. Koska ikärappeuman taustalla on RPE-solujen lisääntynyt oksidatiivinen stressi ja usein myös alhaiset antioksidanttipitoisuudet, on luonnon eri antioksidanttien tehoa ikärappeuman ehkäisykeinona ruvettu tutkimaan (Sin ym. 2012). Monet tutkimukset ovatkin esittäneet, että riittävä antioksidanttien saanti saattaa viivästyttää tai ehkäistä verkkokalvon sairauksien syntymistä (Age-related Eye Disease Research Group 2001, Beatty ym. 2000, Sheu ym. 2010b). Viime aikoina kiinnostusta ovat herättäneet fytokemikaalit (Rhone ja Basu 2008). Tutkituimpia ovat olleet yleisesti tunnetut antioksidantit, kuten luteiini ja A-, C- ja E-vitamiinit, joita esiintyy hedelmissä ja vihanneksissa (Age-related Eye Disease Research Group 2001). Uusimpina lupaavina tutkimuksen kohteina ovat fytokemikaalit, jotka ovat sekä antioksidanteja että omaavat anti-inflammatorisia ominaisuuksia (Rhone ja Basu 2008). Tällaisia ovat muun muassa stilbeenit. Erikoistyössäni tutkimuskohteena on stilbeeneihin kuuluvat trans-resveratrol (kuva 23) ja pinosylviini (kuva 24).

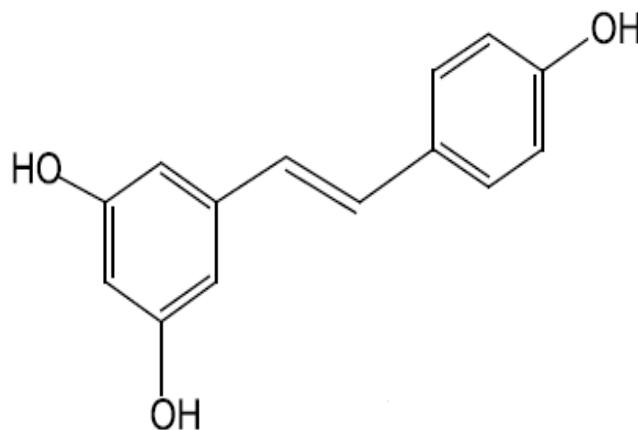


**Kuva 22. Hydrokinonin rakennekuva (McGregor 2007).**





**Kuva 23. Resveratrolin rakennekuva (Lee ym 2005).**



**Kuva 24. Pinosylviinin rakennekuva (Lee ym 2005).**

Resveratrol (3,4',5-trihydroksyylistilbeeni) on polyfenoli, jota on olemassa sekä cis- ja trans-muodossa (Szende ym. 2000). Sitä esiintyy yli 70 eri kasvilajissa, kuten viinirypäleissä, maapähkinöissä sekä punaisissa marjoissa, ja sen perimmäisenä tarkoituksena on suojella kasveja ympäristön rasiukselta ja sienitaudeilta. Monet tutkimukset ovat raportoineet resveratrolilla olevan paljon suotuisia terveysvaikutuksia, kuten syöpää, sydän- ja verisuonitauteja sekä tulehdusta ehkäiseviä ja hermosoluja suojaavia vaikutuksia ja myös antioksidatiivisia ominaisuuksia (Miura ym. 2000, Baur ja Sinclair 2006, Saiko ym. 2008, Pintea ym.

2011). Resveratrolin antioksidanttiivisen aktiivisuuden vuoksi resveratrolin käyttöä myös silmänpohjan ikärappeuman hoidossa on ruvettu tutkimaan. Viimeisimmissä tutkimuksissa on havaittu resveratrolin omaavan suojaavia vaikutuksia oksidatiivista stressiä vastaan RPE-soluissa (King ym. 2005, Sheu ym. 2010, Pintea ym. 2011).

Toinen erikoistyössäni tutkimani aine oli pinosylviini (3,5-dihydroksyyli-trans-stilbeeni), joka on resveratrolin sukulaisaine. Se on pääasiassa mäntypuiden neulasissa ja sydänpuussa esiintyvä luonnon stilbeeni (Park ym. 2011, Lee ym. 2005). Pinosylviini on myös fytoaleksiini, jota muodostuu runsaasti stressitekijöiden, kuten UV-säteilyn tai sienitautien, seurauksena. Sillä on *in vitro* ja *in vivo* kokeissa havaittu olevan hyvin resveratrolia vastaavia funktionaalisia ominaisuuksia, kuten syöpää ehkäiseviä, mikrobien ja sienien kasvua estäviä sekä antioksidatiivisia ominaisuuksia (Fang ym. 2002, Lee ym. 2005, Bauerova ym. 2011, Park ym. 2011). Silmänsairauksien ehkäisyssä tai hoidossa pinosylviinin suojaavista vaikutuksista ei ole vielä ainakaan julkaisuja.

Erikoistyöni tarkoituksena oli tutkia kahden stilbeenin, trans-resveratrolin ja pinosylviinin, mahdollisia suojaavia vaikutuksia ARPE-soluihin oksidatiivisilta vaurioilta. Kyseiset vauriot indusoiitiin hydrokinonilla, joka on tupakansavun yleisin haitallinen aine. Työssä tutkittiin myös stilbeenien toksisuutta.

## 10. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 10.1 Soluviljely

Erikoistyössä käytettiin ihmisestä eristettyä retinan pigmenttiepiteelisolulinjaa ARPE-19 (ATCC, VA, USA). Solujen kasvatusmedium koostui Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (1:1) – liuoksesta (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), johon lisättiin 10 % syntymättömän vasikan seerumia (FBS, fetal bovine serum) (Hyclone, Logan, UT, USA), 100 U/ml penisilliiniä (Lonza, Varviers, Belgia), 100 µg/ml streptomysiiniä (Lonza, Varviers, Belgia) ja 2 mM L-glutamiinia (Lonza, Varviers, Belgia). Soluja ylläpidettiin 10 cm maljoilla (Cellstar, Greiner bio-one, Saksa) ja kasvatusmedium vaihdettiin soluille kaksi kertaa viikossa. Soluja inkuboitiin +37 °C:n lämpötilassa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa.

Ylläpito-hoidossa solut jaettiin, kun ne näyttivät valomikroskoopilla katsottuna konfluenteilta eli yleensä kaksi kertaa viikossa. Solujen jako tapahtui niin, että vanha kasvatusmedium imettiin ensin pois, jonka jälkeen solut huuhdottiin 1 ml 0,5 % trypsiinillä (5% Trypsin-EDTA-liuoksella, Gibco, USA). Huuhdon jälkeen solut irrotettiin lisäämällä maljoille 2 ml samaista trypsiini-EDTA-liuosta ja inkuboimalla noin 5 minuuttia. Solujen irtoaminen tarkastettiin valomikroskoopilla ja irtoaminen varmistettiin koputtamalla maljaa kevyesti. Irronneet solut suspensoitiin kasvatusmediumiin, jonka sisältämä seerumi inaktivoi trypsiini-EDTA-liuoksen vaikutuksen. Solususpensio jaettiin uusille maljoille yleensä 1:3-jakosuhteella. Kokeissa käytettiin soluja, joiden siirostusluku oli 8-9.

### 10.2 LDH-testi

Trans-resveratrolin ja pinosylviinin suojaavia vaikutuksia ARPE-19-soluille hydrokinonin aiheuttamilta soluvaurioilta tutkittiin LDH-testillä. Lisäksi LDH-testi avulla selvitettiin hydrokinonin ja pinosylviinin toksisuutta eri pitoisuuksilla.

LDH-testti on kolorometrinen koe, joka perustuu laktaattidehydrogenaasientsyymin (LDH) aktiivisuuden detektointiin (Korzeniewski ja Callewaert 1983). Laktaattidehydrogenaasientsyymin (LDH) vapautuminen kasvatusmediumiin on merkki solujen vaurioitumisesta tai solukuolemasta, joka johtuu solukalvon vaurioitumisesta (Fotakis ja Timbrell 2006). Sen pitoisuutta voidaan mitata entsyymivälitteisellä reaktioilla, jossa tetratsolium-suola muuttuu punaiseksi formatsaaniksi sitä enemmän, mitä enemmän NADH:ta eli mitä enemmän on hajonneita soluja. Muodostuneen violetin värin määrä on suhteessa vaurioituneiden solujen määrään.

LDH-testiä varten ARPE-solut jaettiin 1:3-suhteella 24-kuoppalevyille (Cellstar, Greiner bio-one, Saksa) ja altistaminen aloitettiin solujen oltua konfluentteja. Ennen altistamista soluille vaihdettiin uusi kasvatusmedium. Ensimmäisissä kokeissa tutkittiin hydrokinonin, pinosylviinin ja trans-resveratrolin toksisuutta. Solut altistettiin 0,1 µM, 1,0 µM, 10 µM, 50 µM sekä 250 µM hydrokinonille (Sigma-Aldrich, USA) sekä 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM ja 100 µM pinosylviinille (PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Saksa) sekä trans-resveratrolille (PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Saksa) 24 tunnin ajan. Altistukset suoritettiin kuutena rinnakkaisena.

Toisessa LDH-kokeessa tutkittiin pinosylviinin ja trans-resveratrolin suojaavia vaikutuksia hydrokinonialtistusta vastaan. Yhteisaltistuksessa solut altistettiin ensin 50 µM ja 100 µM pinosylviinille ja trans-resveratrolille 24 tunnin ajan, jonka jälkeen solut altistettiin 100 µM hydrokinonille 24 tunnin ajan. Altistukset suoritettiin kuutena rinnakkaisena. Koska LDH-testi detektoi vain kuolleita soluja, positiivikontrollina käytettiin maksimaalisen LDH-entsyymin vapautumisen aiheuttavaa 0,8 % Triton<sup>®</sup> X-100-liuosta (Promega, WI, Yhdysvallat), joka aiheutti solujen täydellisen lyysautumisen. Lyysiliuosta lisättiin näytteisiin 10 µl, jonka annettiin inkuboitua kuopilla 45 minuutin ajan inkubaattorissa ennen supernatanttien keräystä. Referenssissä eli taustan mittaajassa näytemedium oli korvattu puhtaalla mediumilla.

Solujen altistusajan jälkeen näytteet kerättiin ja sentrifugoitiin (13 000 rpm, 20 min, +4 °C). LDH-mittaus suoritettiin käyttäen CytoTox 96<sup>®</sup> Non Radioactive Cytotoxicity Assay -kittiä (Promega, WI, Yhdysvallat). Mittausta varten näytteitä pipetoitiin 50 µl

96-kuoppalevyille (Costar, Corning, NY, Yhdysvallat). Tämän jälkeen kuoppiin lisättiin 50 µl kitin substraattiliuosta (LDH Substrate Mix), jonka annettiin inkuboitua kuopilla 30 minuuttia huoneenlämmössä. Inkubaatioajan jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin 50 µl entsyymireaktiota pysäyttävää liuosta (Stop solution). Näytteiden absorbanssi mitattiin spektrofotometrillä (Microplate reader, Bio-Rad Laboratories, Japani) aallonpituudella 490 nm.

### 10.3 MTT-testi

Trans-resveratrolin ja pinosylviinin suojaavia vaikutuksia hydrokinonin aiheuttamilta soluvaurioilta tutkittiin myös solujen elävyyttä tutkivalla MTT-menetelmällä. Menetelmä perustuu solujen mitokondrioiden redukaasientsyymien aktiivisuuteen ja kykyyn pelkistää keltaisen värinen tetratsolium-suola MTT (3-(4,5-dimetyyli-tiatsoli-2-yyli)-2,5-difenyyli tetratsolium bromidi) violetiksi formatsaaniksi (Mosmann 1983). Formatsaani ei läpäise solukalvoja, ja siksi kerääntyy terveisiin, eläviin soluihin. Muodostuvan violetin värin määrä on suhteessa solujen elävyyteen, joka mitataan spektrofotometrisesti.

MTT-koetta varten ARPE-19 solut jaettiin 12-kuoppalevyille (Cellstar, Greiner bio-one, Saksa). Solujen ollessa konfluentteja aloitettiin altistukset. Solut altistettiin 100 µM hydrokinonille, 0,5 µM pinosylviinille ja 10 µM trans-resveratrolille 24 tunnin ajan, sekä yhteisaltistuksessa ensin 0,5 µM pinosylviinille ja 1 µM trans-resveratrolille 24 tunnin ajan, jonka jälkeen solut altistettiin 100 µM hydrokinonille. Kaikki altistukset aloitettiin samanaikaisesti ja ne toteutettiin kuutena rinnakkaisena.

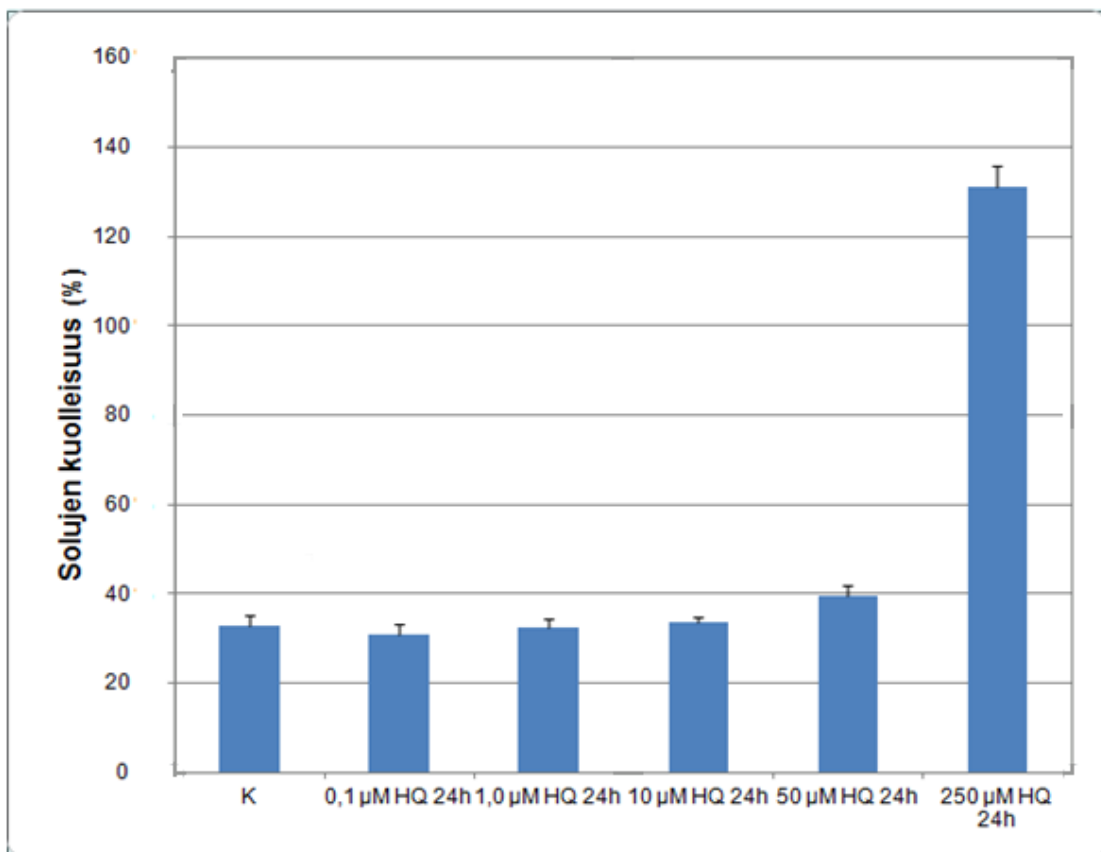
MTT (3-(4,5-dimetyyli-tiatsoli-2-yyli)-2,5-difenyyli tetratsolium bromidi)-testi (Sigma-Aldrich, Saksa) aloitettiin valmistamalla ensin 10 mg/ml MTT-liuos. Tetratsolium-suolaa liuotettiin PBS:ään, jonka jälkeen se steriilisuodatettiin (Minisart<sup>®</sup>, Sartorius Stedim biotech, Schleicher & Schnell, Saksa). Altistuksien päätyttyä suodatettua MTT-liuosta lisättiin 25 µl kuoppiin, joissa oli 500 µl mediumia, ja annettiin inkuboitua 1,5 tuntia + 37 °C:ssa. Sen jälkeen kuoppiin lisättiin 525 µl MTT lyysipuskuria (20 % SDS, 50 % dimetyyliformamidi, pH 4,7), joka indusoi solujen lyysautumisen.

Absorbanssimittausta varten näytteitä pipetoitiin 150 µl 96-kuoppalevyille (Costar, Corning, NY, Yhdysvallat), ja niiden absorbanssit mitattiin spektrofotometrillä (Microplate reader, Bio-Rad Laboratories, Japani) aallonpituudella 550 nm. Referenssissä eli taustan mittaajassa käytettiin näytettä, jossa oli mediumia, MTT-liuosta sekä MTT lyysispuskuria samalla suhteella kuten näytteissäkin.

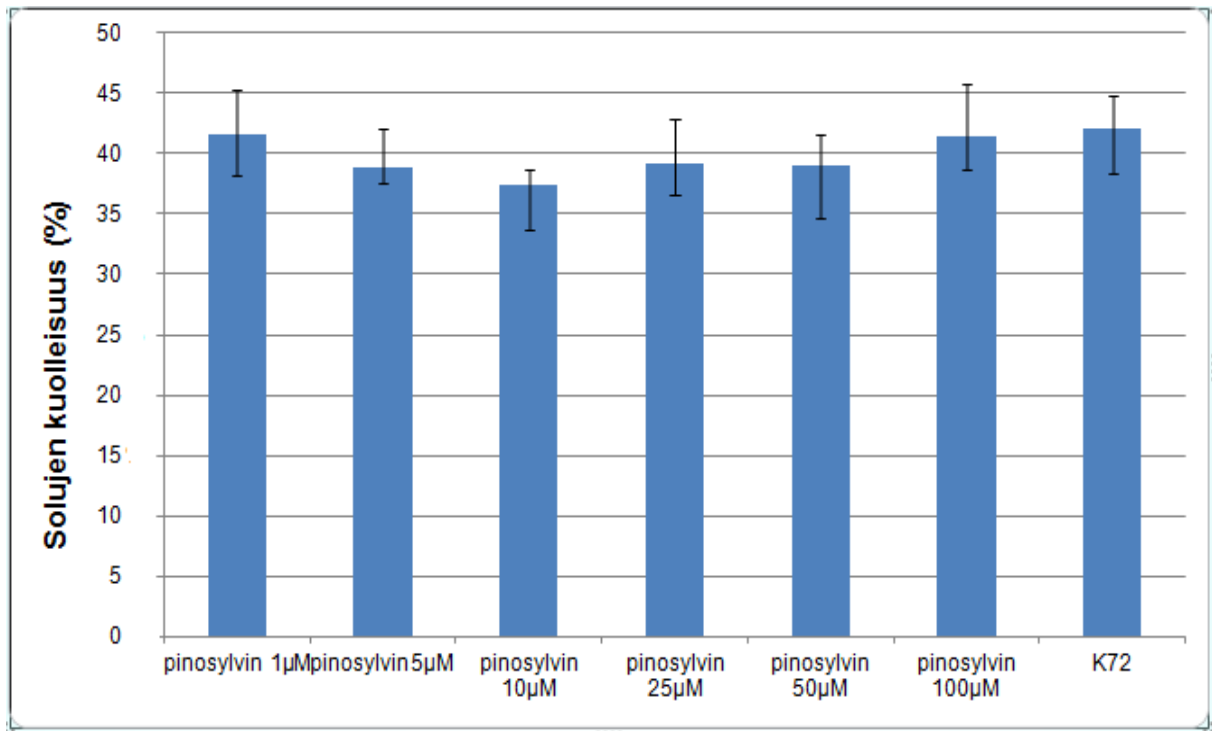
## 11. TULOKSET

### 11.1 LDH-testin tulokset

LDH-testin avulla tutkittiin aluksi hydrokinonin ja pinosylviinin toksisuutta eri pitoisuuksilla ARPE-19-soluille, ja saadut tulokset on esitetty kuvissa 25 ja 26. Tuloksien avulla saatiin hydrokinonille haarukoitua sopiva pitoisuus, jolla se ei aiheuttanut liian suurta toksisuutta. Kuvasta 25 nähdään, että hydrokinonin on hyvin toksinen 250  $\mu\text{M}$  pitoisuudella. Seuraavia LDH-testejä varten hydrokinonin pitoisuudeksi valittiinkin 100  $\mu\text{M}$ .



Kuva 25. Hydrokinonin pitoisuuden vaikutus ARPE-19-solujen elinkykyisyyteen 24 tunnin altistuksen jälkeen LDH-testillä mitattuna (K= 24 tunnin mediumkontrolli).

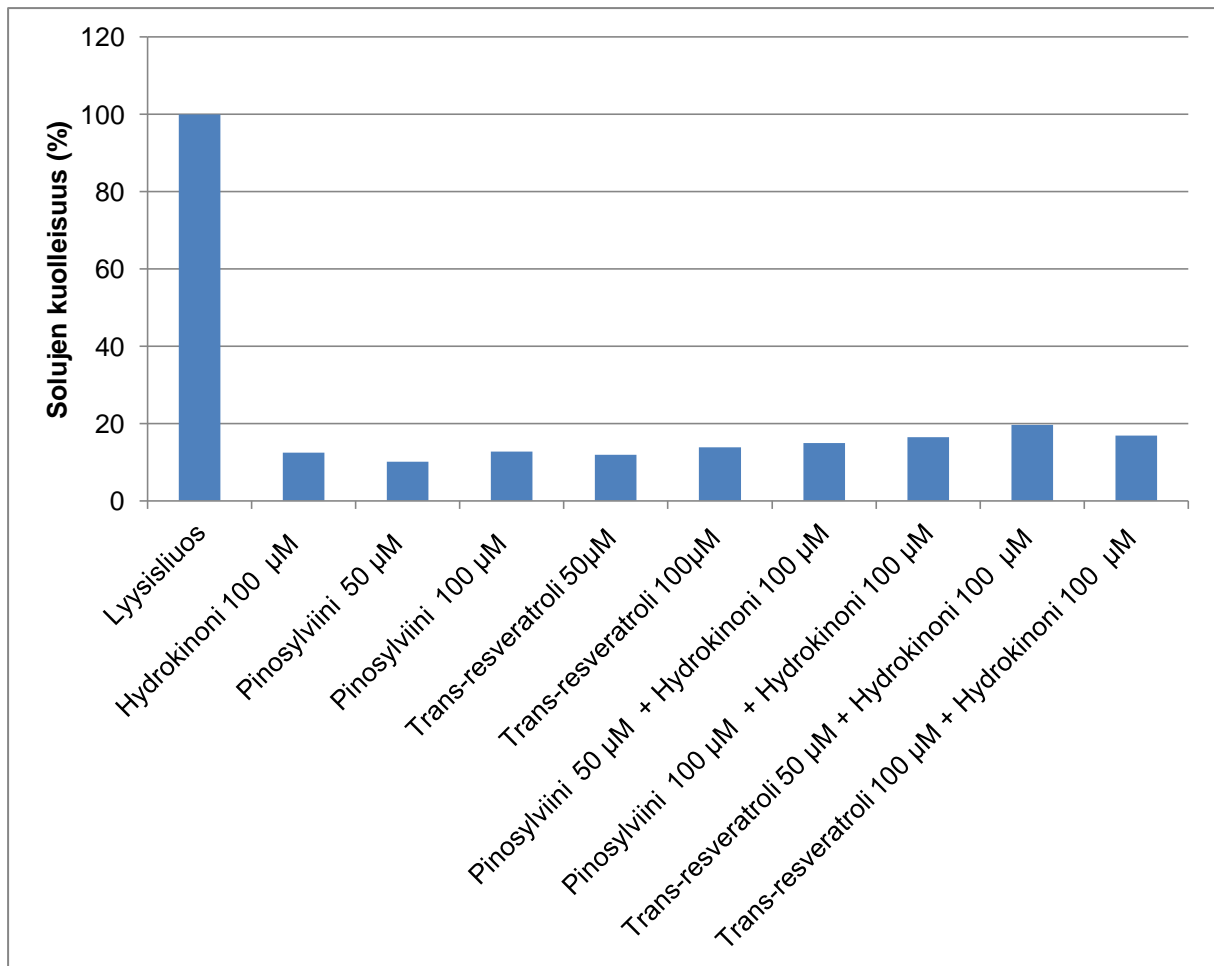


**Kuva 26. Pinosylviinin pitoisuuden vaikutus ARPE-19-solujen elinkykyisyyteen 24 tunnin altistuksen jälkeen LDH-testillä mitattuna (K72=72 tunnin mediumkontrolli).**

Kuvassa 26 voidaan nähdä, että pinosylviini vaikutus solujen elinkykyisyyteen on kaikilla tutkituilla pitoisuuksilla melko samaa luokkaa, eli noin 40 % soluista kuolee. Saatujen tulosten perusteella valittiin yhteisaltistukseen hydrokinonin kanssa pinosylviinin 50 µM ja 100 µM pitoisuudet.

Toksisuuden lisäksi LDH-menetelmällä selvitettiin, onko pinosylviinillä ja trans-resveratrolilla ARPE-19-soluja suojaavia vaikutuksia hydrokinonialtistuksessa. Tulokset on kuvattu kuvassa 27. Stilbeenien suojaavia vaikutuksia ei havaita LDH-testin tuloksissa. Lisäksi hydrokinoni aiheutti 100 µM pitoisuudella odotettua pienemmän solujen kuolleisuuden kuin mitä voitiin odottaa aikaisemman hydrokinonin toksisuuskokeen tulosten perusteella, jolloin soluja kuoli lähes 40 % (kuva 25).



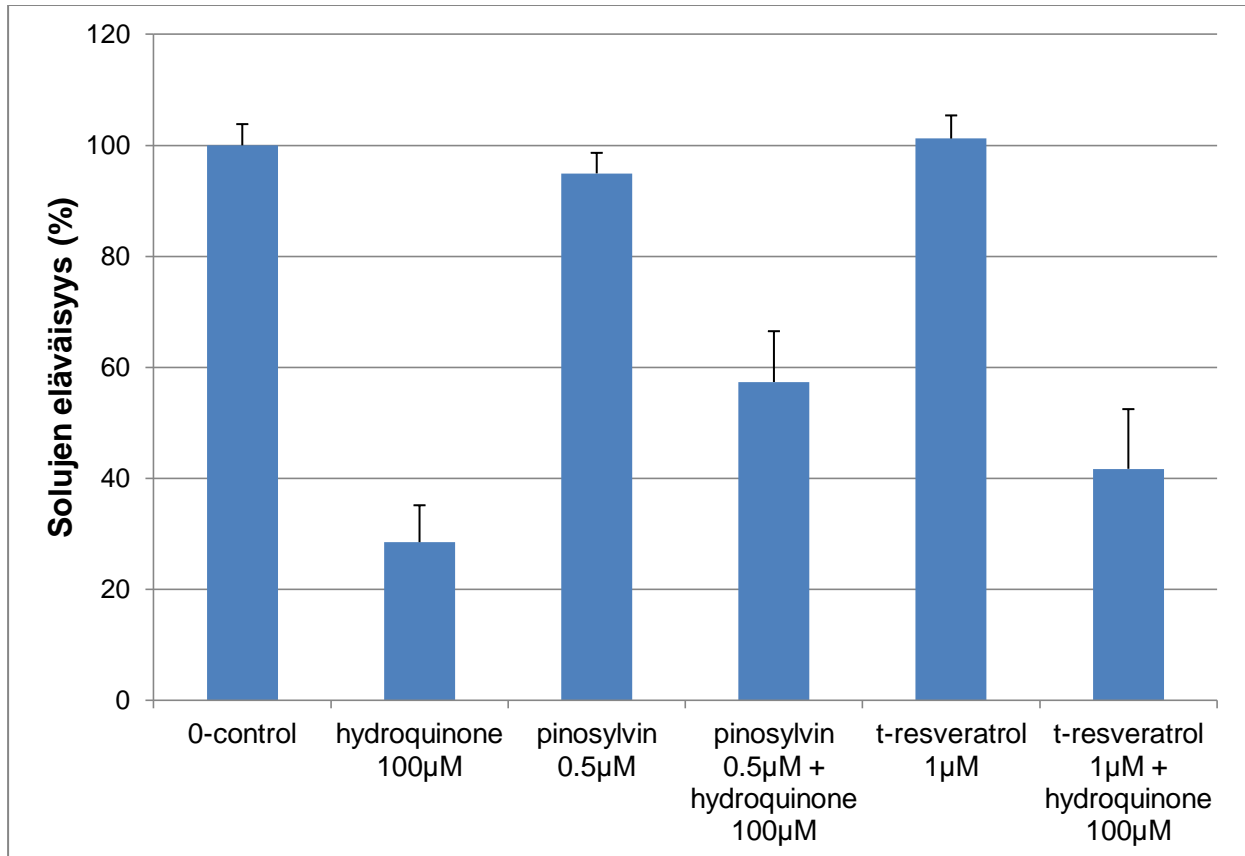


**Kuva 27. Pinosylviinin ja trans-resveratrolin suojaavaa vaikutus ARPE-19-soluihin hydrokinoniantistuksessa 24 tunnin altistuksen jälkeen LDH-testillä mitattuna.**

## 11.2 MTT-testin tulokset

MTT-testi oli toinen menetelmä, jolla tutkittiin pinosylviinin ja trans-resveratrolin ARPE-19-soluja suojaavia vaikutuksia hydrokinoniantistuksessa. Tulokset on esitetty kuvassa 28. Pinosylviinin ja trans-resveratrolin pitoisuudet olivat alhaisemmat kuin LDH-testissä, sillä aikaisempien MTT-tulosten perusteella pinosylviinin tiedetään olevan toksinen 10 µM pitoisuudella (julkaisematon tulos Kaarniranta). Hydrokinoni laski solujen elävyyttä noin 30 %:iin, mutta yhteisaltistuksessa stilbeeneit nostivat solujen elävyyttä. Molemmilla stilbeeneillä oli suojaavia vaikutuksia

hydrokinoniantistuksessa. Pinosylviini nosti solujen elävyyttä 60 %:iin, kun taas trans-resveratrolin elävyys oli hieman yli 40 %.



**Kuva 28. Hydrokinonin, trans-resveratrolin sekä pinosylviinin vaikutus ARPE-19-solujen elävyyteen 24 tunnin aikana MTT-testillä mitattuna. (0-kontrolli=24 tunnin mediumkontrolli).**

## 12. POHDINTA

Silmänpohjan ikärappeuma on johtavin sokeutumisen syy teollisuusmaissa (Kinnunen ym. 2011). Sairauden kehittymismekanismit ovat vieläkin epäselviä, mutta nykykäsityksen mukaan sen taustalla on tärkeässä roolissa oksidatiivinen stressi, jolle verkkokalvon RPE-solut ovat jatkuvasti alttiita. Koska ikärappeuman hoito on rajallista, on viime aikoina ruvettu tutkimaan erilaisten antioksidanttien suojaavia ja ehkäiseviä vaikutuksia ikärappeumaa vastaan. Tällaisia ovat esimerkiksi luonnossa esiintyvät stilbeenit, joilla on havaittu olevan paljon hyviä ominaisuuksia, kuten anti-inflammatorisia, antifungaalisia, antikarsinogeenisia sekä erityisesti antioksidatiivisia ominaisuuksia (Miura ym. 2000, Baur ja Sinclair 2006, Saiko ym. 2008, Pinteä ym. 2011).

Erikoistyöni tarkoituksena oli tutkia kahden stilbeenin, trans-resveratrolin ja pinosylviinin, mahdollisia suojaavia vaikutuksia ARPE-soluihin oksidatiivilta vaurioilta. Kyseiset vauriot indusoitiin hydrokinonilla, joka on tupakansavun yleisin haitallinen aine. Tupakointi on merkittävin ympäristöllinen riskitekijä silmänpohjan ikärappeuman kehittymiselle, sillä tupakoinnin tiedetään lisäävän RPE-solujen oksidatiivista stressitakkaa ja siten nopeuttavan soluvaurion progressiota (Vingerling ym. 1996, Ambati ym. 2003, Pons 2011).

Stilbeenien suojaavia vaikutuksia tutkittiin kahden sytotoksisuuskokeen, MTT ja LDH, avulla. Saadut tulokset eivät olleet yhteneväiset eri testien välillä, sillä vain MTT-testin antoi myönteisiä tuloksia stilbeenien suojaavuudesta. Ristiriitaiset tulokset johtuivat todennäköisesti käytettyjen menetelmien valinnasta. Tutkimuksissa on nimittäin raportoitu, että toksisuusmittauksissa käytetyllä menetelmällä ja tutkittavalla aineella voi olla merkitystä saataviin tuloksiin (Weyermann ym. 2005). LDH-testi voi antaa harhaanjohtavia tuloksia, jos toksinen aine vaikuttaa vain solunsisäiseen toimintaan. Lisäksi käytettäessä alhaisia pitoisuuksia LDH-testin epätarkkuus lisääntyy (Bopp ja Lettieri 2008). Tutkimuksissa on raportoitu myös MTT-testin olevan herkempi detektoimaan varhaisempaan toksisuutta kuin LDH-testin (Fotakis ja Timbrell 2005).

MTT-testin tulokset osoittivat trans-resveratrolin ja pinosylviinin omaavan suojaavia vaikutuksia hydrokinonialtistuksessa. Resveratrolin kohdalla vastaavanlaisia tuloksia sen suojaavista vaikutuksista oksidatiivista stressiä vastaan RPE-soluissa on raportoitu myös muissa tutkimuksissa (King ym. 2005, Sheu ym. 2008, Sheu ja Wu 2009, Mansoor ym. 2010, Pintea ym. 2010, Sheu ym. 2010). Suojaavan vaikutuksen on raportoitu mahdollisesti johtuvan trans-resveratrolin kyvystä stimuloida silmäkudoksessa esiintyviä BK<sub>Ca</sub>-kanavia (engl. *large-conductance calcium-activated potassium channels*) (Sheu ym. 2008, Sheu ym. 2010). Kyseisten kanavien on havaittu olevan tärkeässä roolissa RPE-solujen fagosytoositoiminnassa (Sheu ja Wu 2003). Hapettavien aineiden kyvyn aiheuttaa oksidatiivisia stressiä uskotaan johtuvan niiden kyvystä inhiboida BK<sub>Ca</sub>-kanavien aktiivisuutta estäen näin RPE-solujen fagosytoositoimintaa. Tutkimuksissa on raportoitu myös resveratrolin vähentävän RPE-solujen oksidaatiota sekä hyperproliferaatioita inhiboimalla ekstrasellulaarista signaalivälitteisen kinaasin aktiivisuutta (King ym. 2005).

MTT-tuloksien perusteella pinosylviinillä oli hieman parempi suojaava vaikutus kuin trans-resveratrolilla. Pinosylviinin ehkäisevistä vaikutuksista oksidatiivista stressiä vastaan RPE-soluissa ei ole julkaistu vielä mitään tutkimuksia. Kuitenkin pinosylviini ollessa trans-resveratrolin sukulaisaine voidaan siltä odottaa myös myönteisiä tuloksia silmänpohjan ikärappeuman hoidossa. Lupaavia tuloksia on kuitenkin saatu muun muassa pinosylviinin kyvystä ehkäistä syöpää sekä mikrobien ja sienien kasvua estäviä sekä antioksidatiivisia ominaisuuksia (Fang ym. 2002, Lee ym. 2005, Bauerova ym. 2011, Park ym. 2011). Yleisesti fenolisten yhdisteiden kyky toimia antioksidanttina on raportoitu johtuvan siitä, että ne pystyvät toimimaan pelkistäjinä ja luovuttamaan vetyatomien vapaille radikaaleille.

Silmänpohjan ikärappeuma on verkkokalvon RPE-soluja rappeutava sairaus, jota sairastavia arvioidaan olevan maailmassa noin 50 miljoonaa (Kaarniranta ym. 2009). Sairastavien määrä tulee kuitenkin seuraavien vuosikymmenien aikana moninkertaistumaan. Koska ikärappeuman hoitokeinot ovat hyvin rajalliset, tulisi näiden luonnosta saatavien stilbeenien hyödyntämistä tutkia ehdottomasti lisää, sillä ne voivat olla tulevaisuudessa tärkeässä roolissa ikärappeuman synnyn ennaltaehkäisyssä ja hoidossa.

## 13 LÄHTEET

Amo EM, Urtti A: Current and future ophthalmic drug delivery systems: A shift to the posterior segment. *Drug Discovery Today* 13(3-4): 135–143, 2008

Abrishami M, Ganavati SZ, Soroush D, Rouhbakhsh M, Jaafari MR, Malaekhe-Nikouel B: Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (Avastin) for intravitreal administration. *Retina* 29(5):699-703, 2009

Age-Related Eye Disease Study Research Group: A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Archives Ophthalmology* 119(10): 1417–1436, 2001

Alcazar O, Cousins SW, Marin-Castano ME: MMP-14 and TIMP-2 overexpression protects against hydroquinone-induced oxidant injury in RPE: implications for extracellular matrix turnover. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48: 5662–5670, 2007

Al-Muhammed J, Ozer A, Hincal A: In vivo studies on dexamethasone sodium phosphate liposomes. *Journal of Microencapsulation* 13: 293-306, 1996

Alonso MJ, Sanchez A: The potential of chitosan in ocular drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 55: 1451-1463, 2003

Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP: Age-Related Macular Degeneration: Etiology, Pathogenesis, and Therapeutic Strategies. *Surveys of Ophthalmology* 48(3):257-293, 2003

Baek SH, Park SJ, Jin SE, Kim JK, Kim CK, Hwang JM: Subconjunctivally injected, liposome-encapsulated streptokinase enhances the absorption rate of subconjunctival hemorrhages in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72(3):546-551, 2009

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13: 238-252, 1965

Barza M, Stuart M, Szoka F: Effect of size and lipid composition on the pharmacokinetics of intravitreal liposomes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (5):893-900, 1987

Bauerova K, Poništ S, Mihalová D, Dráfi F, Kuncířová V: Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune processes and oxidative stress. *Interdisciplinary Toxicology* 4(1):33-9, 2011

Baur JA, Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature Reviews. Drug Discovery* (6):493-506, 2006

Beatty S, Koh H-H, Henson D, Boulton M: The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology* 46(2): 115-134, 2000

Bertram KM, Baglole CJ, Phipps RF, Libby RT: Molecular regulation of cigarette smoke induced oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 297(5):1200-1210, 2009

Bochot A, Couvreur P, Fattal E: Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of liposomal delivery. *Progress in Retinal Eye Research* 19(2): 131-147, 2000

Bochot A, Fattal E, Boutet V *et al.*: Intravitreal Delivery of Oligonucleotides by Sterically Stabilized Liposomes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43(1):253-259, 2002

Bochot A, Fattal E: Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *Journal of Controlled Release*, 2012

Bopp S.K, Lettieri T: Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology* 8(8): 1-11, 2008

Budai M, Szabo ZS, Zimmer A, Szögyi M, Grof P: Studies on molecular interactions between nalidixic acid and liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 279: 67–79, 2004

Budai L, Hadju M, Budai M ym.: Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: studies on ciprofloxacin formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 343: 34-40, 2007

Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg P, Jones DP: Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research* 19(2): 205–221, 2000

Camelo S, Lajavardi L, Bochot A ym.: Ocular and systemic bio-distribution of rhodamine-conjugated liposomes loaded with VIP injected into the vitreous of Lewis rats. *Molecular Vision* 13:2263–2274, 2007

Cannon JP, Fiscella R, Pattharachayakul S ym.: Comparative Toxicity and Concentrations of Intravitreal Amphotericin B formulations in a Rabbit Model. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44(5):2112-2117, 2003

Cano M, Thimmalappula R, Fujihara M ym.: Cigarette smoking oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and age-related macular degeneration. *Vision Research* 50: 652-664, 2010

Chen C, Han D, Cai C, Tang X: An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release* 142: 299-311, 2010

Chen C, Han D, Zhang Y, Yuan Y, Tang X: The freeze-thawed and freeze-dried stability of cytarabine-encapsulated multivesicular liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 387(1-2): 147–153, 2010

Chetoni P, Rossi S, Burgalassi S, Monti S, Mariotti S, Saettone MF: Comparison of Liposome-Encapsulated Acyclovir with Acyclovir Ointment: Ocular Pharmacokinetics in Rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 20(2): 169-177, 2004

Claro C, Ruiz R, Cordero E ym.: Determination and pharmacokinetic profile of liposomal foscarnet in rabbit ocular tissues after intravitreal administration. *Experimental Eye Research* 88(3):528-534, 2008

Clemons TE, Milton RC, Klein R, Seddon JM, Ferris FL :Age-Related Eye Disease Study Research Group: Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. *Ophthalmology* 112(4):533-539, 2005

Craig JP, Purslow C, Murphy PJ, Wolffsohn JSW: Effect of a liposomal spray on the pre-ocular tear film. *Contact Lens and Anterior Eye* 33: 83-87, 2010

Cortesi R, Esposito E, Gambarin S, Telloli P, Menegatti E, Nastruzzi C: Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. *Journal of Microencapsulation* 16(2):251-6, 1999

Cortesi R, Argnani R, Esposito E: Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity. *International Journal of Pharmaceutics* 317: 90-100, 2006

Danion A, Arsenault I, Vermette P: Antibacterial activity of contact lenses bearing surface-immobilized layers of intact liposomes loaded with levofloxacin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96(9): 2350-2361, 2006

De Campos AM, Sanchez A, Alonso MJ: Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* 224(1-2): 159-168, 2001

Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH: The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology* 120(11):1435-1442, 2002

Ebrahim S, Peyman GA, Lee PJ: Applications of liposomes in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 50(2):167-182, 2005

Eljarrat-Binstock E, Pe'er J, Domb AJ: New techniques for drug delivery to the posterior eye segment. *Pharmaceutical Research* 27(4): 530-541, 2010

El-Gazayerly ON, Hikal AH: Preparation and evaluation of acetazolamide liposomes as an ocular delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 158: 121-127, 1997



El-Nesr OH, Yahiya SA, El-Gazayerly ON: Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 217–224, 2010

Fang JG, Lu M, Chen ZH ym.: Antioxidant effects of resveratrol and its analogues against the free-radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles. *Chemistry* 8(18):4191-4198, 2002

Fawzia SH, Fouad EA, Abdel-Rhaman MS, Fathalla D: Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in vitro studies. *Acta Ophthalmology* 88:901-904, 2010

Fine SL, Berger JW, Maguir MG, Ho AC: Age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 342: 483-492, 2000

Fotakis G, Timbrell JA: In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assays in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters* 160: 171-177, 2006

Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK: Recent Perspectives in Ocular Drug Delivery. *Pharmaceutical Research* 26(5):1197-1216, 2009

Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, Mitra AK: Ocular drug delivery. *The AAPS journal* 12(3):348-60, 2010

Gupta SK, Velpandian T, Dhingra N, Jaiswal J: Intravitreal pharmacokinetics of plain and liposome-entrapped fluconazole in rabbit eyes. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 16(6): 511-518, 2000

Habib F, Fouad E, Abdel-Rhaman M, Fathalla D: Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in vitro studies. *Acta Ophthalmologica* 88: 901-904, 2010

Hathout R, Mansour S, Mortada N, Guinedi A: Liposomes as an ocular delivery system for acetazolamide: in vitro and in vivo studies. *The AAPS PharmSciTech* 8(1):1, 2007

Hironaka K, Inokuchi Y, Tozuka Y, Shimazawa M, Hara H, Takeuchi H: Design and evaluation of a liposomal delivery system targeting the posterior segment of the eye. *Journal of Controlled Release* 136: 247-253, 2009

Hironaka K, Fujisawa T, Sasaki H ym.: Fluorescence Investigation of the Retinal delivery of Hydrophilic Compounds *via* Liposomal Eyedrops. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34(6): 894-897, 2011

Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME ym.: Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature Medicine* 14(2):194-8, 2008

Honda M, Asai T, Umemoto T, Araki Y, Oku N, Tanaka M: Suppression of Choroidal Neovascularization by Intravitreal Injection of Liposomal SU5416. *Archives Ophthalmology* 129(3):317-321, 2011

Hornof M, Toropainen E, Urtti A: Cell culture models of the ocular barriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60: 207-225, 2005

Hosny K: Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin. *The AAPS PharmSciTech* 10(4):1336-1342, 2009

Hosny K: Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. *The AAPS PharmSciTech* 11(1):241-246, 2010a

Hosny K: Optimization of gatifloxacin liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation. *Journal of Liposome Research* 20(1): 31-37, 2010b

Inokuchi Y, Hironaka K, Fujisawa T ym.: Physicochemical properties affecting retinal drug/coumarin-6 delivery from nanocarrier systems via eyedrop administration. *Investigate Ophthalmology and Visual Science* 51(6):3162-3170, 2010

Jaakkola A: Silm­pohjan ik­rappeuman fotodynaaminen hoito. *L­l­ketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 118(8):813-819, 2002

Jager RD, Aiello LP, Patel SC, Cunningham ET Jr: Risks of intravitreal injection: a comprehensive review. *Retina* 24(5):676-98, 2004

- Jahn A, Vreeland WN, DeVoe DL, Locascio LE, Gaitan M.: Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir* 23(11): 6289-6293, 2007
- Jain AK, Chalasabu KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV: Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *Journal of Drug Targeting* 15(6): 417-427, 2007
- Jesorka A, Orwar O: Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1: 801-832, 2008
- Jia L, Liu Z, Sun L ym.: Acrolein, a Toxicant in Cigarette Smoke, Causes Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction in RPE Cells: Protection by (*R*)- $\alpha$ -Lipoic Acid. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48(1): 339-348, 2007
- Järvinen K, Järvinen T, Urtti A: Ocular absorption following topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 3-19, 1995
- Kaarniranta K, Sihvola R, Salminen A, Lammi M, Teräsvirta M, Kontkanen M: Silmänpohjan ikärappeuma–vaikea ongelma sekä potilaalle että silmälääkärille. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 119(10):935-942, 2003
- Kaarniranta K, Seitsonen S, Paimela T, Meri S, Immonen I: Silmänpohjan ikärappeuman patogeneesi. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim* 125(2):145-53, 2009
- Kassem MA, Rahman AAA, Ghorab MM, Ahmed MB, Khalil RM: Nanosuspension as an ophthalmic delivery system for certain glucocorticoid drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 340: 126-133, 2007
- Kaur IP, Garg A, Singla A, Aggarwal D: Vesicular systems on ocular drug delivery: an overview. *International Journal of Pharmaceutics* 269: 1-14, 2004
- Kaur IP, Smitha R: Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28(4): 353-369, 2002

Kawakami S, Harada A, Sakanaka K ym.: In vivo gene transfection via intravitreal injection of cationic liposome/plasmid DNA complexes in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, 278(2):255–262, 2004

Kaur IP, Kanwar M: Ocular preparations: the formulation approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28(5): 473-493, 2002

Khan JC, Thurlby DA, Shahid H: Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *The British Journal of Ophthalmology* 90(1):75-80, 2006

King RE, Kent KD, Bornsler JA: Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chemico-biological Interactions* 151(2):143-9, 2005

Kinnunen K, Petrovski G, Moe MC, Berta A, Kaarniranta K: Molecular mechanism of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmologica*: 1-11, 2011

Kivelä T: Silmän rakenne ja toiminta. Kirjassa *Silmätautioppi*, ss. 12-36, 6. painos. Toim. Saari KM, Kandidaattikustannus Oy, Helsinki 2011

Klein R, Knudtson MD, Cruickshanks KJ, Klein BEK: Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology* 126(1):115-12, 2008

Korzeniewski C, Callewaert DM: An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 64: 313-320, 1983

Lajavardi L, Bochot A, Camelo S ym.: Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of vasoactive intestinal peptide encapsulated in liposomes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48(7):3230-8, 2007

Law S, Huang K, Chiang C: Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery corneal penetration and absorption. *Journal of Controlled Release* 63: 135-140, 2000

Lee SK, Lee HJ, Min HY ym.: Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* 76(2):258-60, 2005

Li N, Zhuang C, Wang M, Sun X, Nie S, Pan W: Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 379: 131-138, 2009

Lian T, Ho R: Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (6): 667-680, 2001

Liang F-Q, Godley BF: Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 4(1): 397–403, 2003

Mahmoud SS, Gehman JD, Azzopardi K, Robins-Browne RM, Separovic F: Liposomal phospholipid preparations of chloramphenicol for ophthalmic applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97: 2691-2701, 2008

Mainardes RM, Urban MCC, Cinto PO ym.: Colloidal carriers for ophthalmic drug delivery. *Current Drug Targets* 6: 363-371, 2005

Maïssa C, Guillon M: Tear film dynamics and lipid layer characteristics-effect of age and gender: *Contact lens & anterior eye* 33(4): 176-182, 2010

Mansoor S, Guota N, Patil AJ ym.: Inhibition of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells treated with benzo(e)pyrene, a toxic component of cigarette smoke. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(5):2601-2607, 2010

McCalden TA, Levy M: Retention of topical liposomal formulations on the cornea. *Experientia* 46(7): 713-715, 1990

McGregor D: Hydroquinone: An Evaluation of the Human Risks from its Carcinogenic and Mutagenic Properties. *Critical Reviews in Toxicology*, 37:887–914, 2007

Mehanna M, Elmaradny H, Samaha M: Ciprofloxacin liposomes as vesicular reservoirs for ocular delivery: formulation, optimization, and in vitro characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 35:583-593, 2009

Mehanna MM, El-maradny HA, Samaha MW: Mucoadhesive liposomes as ocular drug delivery system: physical, microbiological, and in vivo assessment. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36(1):108-118, 2010

Meisner D, Mezei M: Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16: 75-93, 1995

Meure L, Foster N, Dehghani F: Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. *AAPS PharmSciTech*. 9(3): 798-809, 2008

Meure LA, Knott R, Foster NR, Dehghani F: The depressurization of an expanded solution into aqueous media for the bulk production of liposomes. *Langmuir* 25(1): 326-337, 2009

Mishra G, Mahuya B, Tamboli V, Mitra A: Recent Applications of Liposomes in Ophthalmic Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery* 2011: 1-4, 2011

Miura T, Muraoka S, Ikeda N, Watanabe M, Fujimoto Y: Antioxidative and Prooxidative Action of Stilbene Derivatives. *Pharmacology and Toxicology* 86(5):203-208, 2000

Mohammed AR, Vincent WB, Coombes AGA, Perries Y: Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods* 40 (1): 30-38, 2006

Monem AS, Ali FM, Ismail MW: Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits. *International Journal of Pharmaceutics* 198: 29-38, 2000

Moon J-W, Song Y-K, Jee J-P, Kim C-K, Choun H-K, Hwang J-M: Effect of subconjunctivally injected, liposomal-bound low-molecular-weight heparin on the absorption rate of subconjunctival hemorrhage in rabbits. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 47(9): 3968-3974

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983

Mozafari MR, Reed CJ, Rostron C, Kocum C, Piskin E: Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: a preliminary investigation. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7(3):923-927, 2002

Mozafari M: Liposomes: An overview of manufacture techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10 (4): 711-719, 2005

Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, ym.: Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB Journal* 14(7):835–846, 2000

Nagarsenker M, Londhe V: Preparation and evaluation in ophthalmic drug delivery of sodium cromoglicate. *International Journal of Pharmaceutics* 251: 49-56, 2003

Nagarsenker M, Londhe V, Nadkarni GD: Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 190: 63-71, 1999

Natarajan J, Chattopadhyay S, Ang M ym.: Sustained release of an anti-glaucoma drug: demonstration of efficacy of a liposomal formulation in the rabbit eye. *PLoS One* 6(9):1-10, 2011

Natarajan JV, Ang M, Darwitan A, Chattopadhyay S, Wong TT, Venkatraman SS: Nanomedicine for glaucoma: liposomes provide sustained release of latanoprost in the eye. *International Journal of Nanomedicine* 7:123-31, 2012

Nordmann JP, Auzanneau N, Ricard S, Berdeaux G: Vision related quality of life and topical glaucoma treatment side effects. *Health and Quality of Life Outcomes* 1:75, 2003

Ohsawa T, Miura H, Harada K: A novel method for preparing liposome with a high capacity to encapsulate proteinous drugs: freeze-drying method. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 32(6):2442-5, 1984

Otake K, Imur T, Skai H, Abe M: Development of a New Preparation Method of Liposomes Using Supercritical Carbon Dioxide. *Langmuir* 17: 3898-3901, 2001

Otake K, Shimomura T, Goto T ym: Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir* 22(6):2543–2550, 2006.

Park EJ, Park HJ, Chung HJ ym.: Antimetastatic activity of pinosylvin, a natural stilbenoid, is associated with the suppression of matrix metalloproteinases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011

Perschka-Suss R, Denny C. Szoka F: A simple in vitro model to study the release kinetics of liposome encapsulated material. *Journal of Controlled Release* 56: 41-51, 1998

Peyman GA, Lad EM, Moshfeghi DM: Intravitreal injection of therapeutic agents. *Retina* 29(7): 875 -912, 2009

Pintea A, Rugina D, Pop R, Bunea A, Socaciu C, Diehi HA: Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human reginal pigment epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 27(4): 315-321, 2011

Pons M, Cousins SW, Csaky KG, Striker G, Marin-Castaño ME: Cigarette smoke-related hydroquinone induces filamentous actin reorganization and heat shock protein 27 phosphorylation through p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in retinal pigment epithelium. *The American Journal of Pathology* 177(3): 1198-1213, 2010

Pons M, Marin-Castaño ME: Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo.. *PloS One* 6(2): e16722, 2011

Rhone M, Basu A: Phytochemicals and age-related eye diseases. *Nutrition Reviews* 66(8):465-72, 2008

Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S: Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discovery Today* 13 (3-4): 144-151, 2008

Saikog P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T: Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research* 658(1-2):68-94, 2008



Samad A, Sultana Y, Aqil M: Liposomal drug delivery systems: an update review. *Current Drug Delivery* 4: 297-305, 2007

Schaeffer HE ja David LK: Liposomes in topical drug delivery. *Investigations in Ophthalmological Visionary Sciences* 22: 220-227, 1982

Shafaa M, Neveen M, Fouad R: The extended ocular hypotensive effect of positive liposomal cholesterol bound timolol maleate in glaucomatous rabbits. *Bioharmaceutics and Drug Disposition* 32(9):507-517, 2011a

Shafaa M, El shazly L, El shazly A, El gohary A, El hossary G: Efficacy of topically applied liposome-bound tetracycline in the treatment of dry eye model. *Veterinary Ophthalmology* 14(1): 18-25, 2011b

Shah SS, Denham LV, Elison JR ym: Drug delivery to the posterior segment of the eye for pharmacologic therapy. *Expert Review of Ophthalmology* 5(1): 75-93, 2010

Sharma A, Sharma U: Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics* 154: 123-140, 1997

Shen Y, Tu J: Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. *The AAPS PharmSciTech* 9(3):E371-7, 2007

Sheu SJ, Wu SN: Mechanism of inhibitory actions of oxidizing agents on calcium-activated potassium current in cultured pigment epithelial cells of the human retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44(3):1237-1244, 2003

Sheu SJ, Bee YS, Chen CH: Resveratrol and large-conductance calcium-activated potassium channels in the protection of human retinal pigment epithelial cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 24(6):551-555, 2008

Sheu SJ, Wu TT: Resveratrol protects against ultraviolet A-mediated inhibition of the phagocytic function of human retinal pigment epithelial cells via large-conductance calcium-activated potassium channels. *The Kaohsiung Journal of Medical Science* 25(7):381-8, 2009

Sheu S-J, Liu N-C, Chen J-L: Resveratrol protects human retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced damage. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 26(3): 231 - 236, 2010

Shimazaki H, Hironaka K, Fujisawa T ym.: Edaravone-Loaded Liposome Eyedrops Protect against Light-Induced Retinal Damage in Mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52(10):7289-7297, 2011

Sin HPY, Liu DTL, Lam DSC: Lifestyle modification, nutritional and vitamins supplements for age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmology* 1-6, 2012

Smolin G, Okumoto M, Feiler S, Condon D: Iodoxuridine-liposome therapy for herpes simplex keratitis. *American Journal of Ophthalmology* 91(2):220-225, 1981

Szende B, Tyihak E, Király-Véghely Z: Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Experimental and Molecular Medicine* 32(2): 88-92, 2000

Szoka F Jr, Papahadjopoulos D: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering* 9:467-508, 1980

Taniguchi K, Yamamoto Y, Itakura K, Miichi H, Hayashi S: Assessment of ocular irritability of liposome preparations. *Journal of Pharmacobio-dynamics* 11(9):607-11, 1988

Tardi S, Drechsler M, Bauer K, Brandi M: Steam sterilisation of vesicular phospholipid gels. *International Journal of Pharmaceutics* 217(1-2): 161-172, 2001

Thirimawithana TR, Young S, Bunt CR, Green C, Alany RG: Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discovery Today* 16(5): 270-276, 2011

Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP: Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye* 19, 935–944, 2005

Urtti A: Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58: 1131-1135, 2006

Velpandian T, Narayanan K, Nag TC, Ravi AK, Gupta SK: Retinal toxicity of intravitreally injected plain and liposome formulation of fluconazole in rabbit eye. *Indian Journal of Ophthalmology* 54: 237-240, 2006

Vermuri S, Rhodes CT: Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 70: 95-111, 1995

Vingerling JR, Hofman A, Grobbee DE, de Jong P: Age-Related Macular Degeneration and Smoking. *Archives Ophthalmology* 114(10):1193-1196, 1996

Wadhwa S, Paliwal R, Paliwal SR, Vyas SP: Chitosan and its Role in Ocular Therapeutics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 9(14):1639-47, 2009

Watwe RM, Bellare JR: Manufacture of liposomes: A review. *Current Science* 68(7):715-724, 1995

Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A: A practical note of the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288(2): 369-376, 2005

Yildirim Z, Ucgun NI, Yildirim F: The role of oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Clinics (Sao Paulo)*. 66(5): 743–746, 2011

Zhang R, He R, Qian J, Guo J, Xue K, Yuan Y-F: Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with intravitreal injection of tacrolimus (FK506) encapsulated in liposomes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(7): 3575-3582, 2010

Zhang J, Guan P, Wang T ym.: Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of cytochrome c against selenite cataract formation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61: 1171-1178, 2009

Zhang J, Wang S: Topical use of coenzymeQ<sub>10</sub>-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan: Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. *International Journal of Pharmaceutics* 372: 66-75, 2009

Zuidam N, Verluisb C, Vernooy E, Crommelin D: Gamma-irradiation of liposomes composed of saturated phospholipids. Effect of bilayer composition, size,

concentration and absorbed dose on chemical degradation and physical destabilization of liposomes. *Biochimica and Biophysics Acta* 1280(1): 135-148, 1996