

Ilona van der Weij

ROCK- INHIBIITTORIT SARVEISKALVON ENDOTEELITERAPIASSA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatin tutkielma
Maaliskuu 2024

TIIVISTELMÄ

Ilona van der Weij : ROCK- inhibiittorit sarveiskalvon endoteeliterapiassa
Kandidaatin tutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologia ja biolääketieteen tekniikka
Maaliskuu 2024

Sarveiskalvon endoteelisolut ovat sarveiskalvon pohjan soluja, jotka vastaavat nesteenoistosta sarveiskalvon valtaosan koostavasta stroomasta. Nesteenoisto on kriittistä sarveiskalvon kirkkauden ylläpitämiseksi ja siksi siihen kohdistuvat vauriot uhkaavat näkökykyä. Haastavan vaurioitilanteiden hoitamisesta tekee endoteelisolujen luonnostaan heikko jakautumiskyky, jonka vuoksi vaurioiden korjaantuminen itsestään on vähäistä. ROCK- signaalintireittiä inhiioivista ROCK- inhiioitoreista on lupaavaa näyttöä endoteelisolujen jakautumisen ja liikkeen aktivoimisessa vaurioalueella. ROCK- inhiioittorit vaikuttavat solun tukirangan, erityisesti aktiinin, ominaisuuksiin ja säätelevät geenien ilmentymistä. Ne vaikuttavat solujen välisten sekä solun ja soluväliaineen välisten liitosten syntyyn vähentämällä tiiviiden liitosten ja fokaaliadheesioiden muodostumista. Vaikutukset liitoksiin sekä ROCK- inhiioitiosta johtuva solukalvon haaroittuminen edesauttavat solujen liikettä ympäristössään. Solunjakautumista edistää sykliini D- ja p27- geenien ilmentymisen säätely sekä apoptoosin ehkäisy tukiranganmuokkauksilla.

Netarsudiili, ripasudiili, fasudiili ja belumosudiili ovat kaikki myyntiluvallisia ROCK- inhiioitoreita, mutta netarsudiilista ja ripasudiilista on kertynyt enemmän kokemusta endoteelivaurioiden hoidossa. Y-27632 on laajasti akateemisessa tutkimuksessa hyödynnetty ROCK- inhiioittori, josta on kokemusta myös endoteelivaurioiden hoidossa, mutta sillä ei toistaiseksi ole lääkkeenä myyntilupaa. Netarsudiili on aihiolääke ja metaboloituu sarveiskalvon esteraasien vaikutuksesta aktiiviseksi metaboliitikseen. Affiniteettinsa sekä soluviljelmissä käytetyn optimaalisen pitoisuutensa perusteella netarsudiili ja sen aktiivinen metaboliitti ovat tehokkaampia inhiioitoreita kuin ripasudiili ja Y-27632.

Tämän tutkielman tarkoituksena on perehtyä ROCK- inhiioittoreihin, joita tyypillisesti on käytetty endoteelisolututkimuksessa, sekä niiden ominaisuuksiin ja käyttökohteisiin sarveiskalvon endoteelin näkökulmasta. Sarveiskalvon endoteeli ja sen tyvikalvo, descemetin kalvo, toimivat tiiviissä yhteistyössä silmässä, joten kalvon ominaisuuksia ja ROCK- inhiioittorien vaikutuksia descemetin kalvoon sivutaan tutkielmassa. Endoteelin vaurioita on tyypillisesti hoidettu leikkauskirurgisilla menetelmillä vainajaluovuttajien kudossiirteillä, joiden käyttöä kuitenkin rajoittavat huono saatavuus sekä immunologiset reaktiot. ROCK- inhiioittorien avulla on voitu vähentää kudossiirteiden tarvetta, esimerkiksi hyödyntämällä niitä Fuchsin dystrofian, yhden merkittävimmistä endoteelia vaurioittavista sairauksista, hoidossa sekä luovuttajien solumäärän maksimoimisessa soluviljelmäkasvatuksilla.

Avainsanat: Sarveiskalvon endoteelisolut, ROCK- inhiioittorit, netarsudiili, ripasudiili, Y-27632, descemetin kalvo

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä työ on tehty Tampereen Yliopistossa MET tiedekunnassa Bioteknologian ja Biolääketieteen kandidaatin tutkintoa varten. Haluan kiittää tiedekuntaa aiheiden monipuolisesta valikoimasta sekä opastuksesta valintaan ja tutkielman aloitukseen. Aihe valittiin oman mielenkiinnon mukaan ja pohjustamaan mahdollisia tulevaisuuden tutkimuksia ROCK- inhibiittoreilla.

Erityiskiitos ohjaajalleni Heli Skottmanille, joka mahdollisti mielenkiintoisen aiheen valinnan ja oli koko kirjoitusprosessin ajan nopeasti saavutettavissa. Apua oli helppo saada ja pyytää matalalla kynnyksellä ja sainkin kallisarvoisia ja konkreettisia vinkkejä työni parantamiseen. Kiitokset haluan myös välittää Katri Lindforsille avusta tutkielman rakenteeseen liittyvissä haasteissa. Lähipiirilleni kiitos jatkuvasta kannustuksesta työn eri vaiheissa.

Tampereella, 04.03.2024

Ilona van der Weij

SISÄLLYSLUETTELO

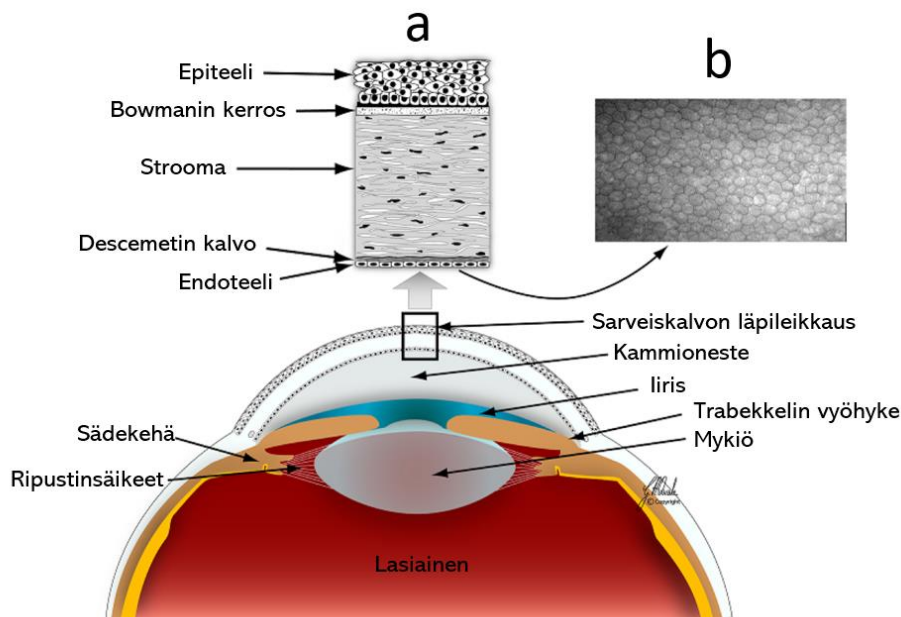
1. JOHDANTO	5
2. ROCK- SIGNALOINTI SARVEISKALVON ENDOTEELISOLUISSA	7
2.1 Sarveiskalvon endoteelin ja descemetin kalvon ominaisuudet	7
2.1.1 Sarveiskalvon endoteeli	7
2.1.2 Descemetin kalvo	7
2.1.3 Uusiutumiskyky	8
2.2 Rho- kinaasi reitti	9
2.3 ROCK- inhibio sarveiskalvon endoteelisoluissa	12
2.3.1 Myyntiluvalliset ROCK- inhibiittorit ja ROCK- homologiaffiniteetit	13
2.3.2 Netarsudiilin ja ripasudiilin lääkemuodot	17
3. ENDOTEELIVAURIOIDEN HOITO ROCK- INHIBIITTORIAVUSTEISESTI	19
3.1 Fuchsin dystrofia	20
3.2 Strooman arpeutumisen esto	21
3.3 Descemetin kalvon uusiutuminen	22
3.4 Endoteelisolujen in vitro- kasvatus	22
4. YHTEENVETO	24
5. LÄHDELUETTELO	26

KÄSITTEET

AR-13324	= Netarsudiili, ROCK- inhibiittori
AR-13503	= Netarsudiilin aktiivinen metaboliitti, ROCK- inhibiittori
Descemetin kalvo	= Sarveiskalvon endoteelin tyvikalvo
DSO	= Sarveiskalvon vaurioitunutta endoteelia ja descemetin kalvoa poistava toimenpide, (eng. Descemet Stripping Only), sama kuin DWEK
DWEK	= Sarveiskalvon vaurioitunutta endoteelia ja descemetin kalvoa poistava toimenpide, (eng. Descemetorhexis Without Endothelial Keratoplasty), sama kuin DSO
EndMT	= Endoteelisolujen erilaistuminen mesenkymaalisoluja muistuttavaan suuntaan (eng. Endothelial-to-mesenchymal-transition)
FECD	= Fuchsin dystrofia (eng. Fuchs' endothelial corneal dystrophy)
K-115	= Ripasudiili, ROCK- inhibiittori
ROCK	= Rho- kinaasi / Rho- aktivoitu kinaasi
ROCK- inhibiittori	= Rho- kinaasin inhibiittori
Sarveiskalvon endoteeli	= sarveiskalvon endoteelisoluista muodostuva yksisoluinen kerros sarveiskalvon takaosassa
TGF- β	= transformoiva kasvutekijä β (eng. Transforming growth factor)

1. JOHDANTO

Sarveiskalvo on silmän terveydelle ja näkökyvylle välttämätön suojaava ja läpinäkyvä kalvo. Se sijaitsee silmän etuosassa muodostuen viidestä kerroksesta: epiteelistä, bowmanin kerroksesta, stroomasta, descemetin kalvosta ja yksisoluisesta endoteelikerroksesta (Kuva 1). Epiteelikerros on sarveiskalvon uloin osa ja huolehtii ulkoisten stressitekijöiden lieventämisestä uusiutumalla jatkuvasti. (Sridhar 2018) Strooma taas on sarveiskalvon paksuin osa, jonka sisältämien solujen ja soluväliaineen proteiinisisäikeiden järjestäytyminen tarkoituksenmukaisesti on tärkeää strooman läpinäkyvyyden säilyttämiseksi (Price ym. 2021). Epiteelin ja strooman välinen bowmanin kerros tukee strooman kaarevuutta (Sridhar 2018). Strooman komponenttien järjestäytymistä voi häiritä liiallinen nesteen kertyminen stroomaan, mitä ehkäisevät tyvikalvoonsa, descemetin kalvoon, kiinnittyneet endoteelisolut, jotka vastaavat nesteen poistamisesta stroomasta kammionesteeseen pumppuominaisuuksillaan (Price ym. 2021).



Kuva 1. Silmän etuosan ja sarveiskalvon anatomiaa. (a) Sarveiskalvon läpileikkaus, josta nähdään sen viisi kerrosta. Uloimpana epiteeli ja sisimpänä yksisoluisen endoteelikerros. (b) Konfokaalimikroskooppikuva, jossa näkyy endoteelikerros ja endoteelisolujen heksagonaalinen muoto. (Muokattu lähteestä Navaratnam ym. 2015).

Strooman samentuminen nesteen kertyessä tai arpikudoksen kehittyessä voi aiheuttaa näön hämärtymistä ja jopa sokeutumista (Moura-Coelho ym. 2019, de Oliveira ja Wilson, 2020). Syynä samentumiseen ovat useimmiten endoteelin ja descemetin kalvon vauriot, jolloin endoteelisolujen kyky pumppata nestettä stroomasta on heikentynyt ja endoteelin muodostama kammionesteen ja strooman välinen este on vaurioitunut (de Oliveira ja Wilson, 2020, Price ym. 2021). Tyypillisesti

vaurioita on hoidettu vainajaluovuttajien kudossiirteillä, joihin liittyvät leikkauskirurgiset menetelmät ovat kehittyneet huomattavasti vuosien saatossa (Price ym. 2021). Alkujaan vaurioita on hoidettu PK- tekniikalla (eng. penetrating keratoplasty), jossa sarveiskalvoa poistetaan sen koko paksuudelta ja asetetaan poistetun osan leveyttä vastaava kudossiirre (Ong ym. 2021, Price ym. 2021). Sitten tekniikoita on kehitetty vähemmän invasiiviseen suuntaan hyödyntäen EK- tekniikkaa (eng. endothelial keratoplasty), jossa potilaan omaa sarveiskalvoa poistetaan vähemmän eli epiteeliä ja bowmanin kerrosta ei poisteta ja stroomaakin pyritään poistamaan mahdollisimman ohuelti (Ong ym. 2021, Price ym. 2021).

Kudossiirteiden varjopuoli on kuitenkin niiden huono saatavuus tarpeeseen nähden (Price ym. 2021). Yleisimpiä syitä kudossiirteiden tarpeelle ovat endoteelisoluvauriot, sillä endoteelisolut eivät juurikaan jakaudu itsestään (Syed ja Rapuano 2021, Karri ja Chong, 2023). Niihin kohdistuvien vaurioiden korjaaminen vaatii joko solusiirteen kuolleelta luovuttajalta tai potilaan omien solujen jakautumisen tehostamista. Hiljattain on kiinnitetty kasvavasti huomiota ROCK- inhibiittorien vaikutuksiin sarveiskalvossa, jossa niillä on havaittu lisäävän endoteelisolujen liikettä ja jakautumista (Kopečný ym. 2023). ROCK- inhibiittorit luovat mahdollisuuksia sivuuttaa endoteelisolujen jakautumiseen liittyviä haasteita ja mahdollisesti vähentävät kudossiirteiden tarvetta tulevaisuudessa. Tässä tutkielmassa perehdytään ROCK- inhibiittorien vaikutuksiin endoteelisoluissa ja descemetin kalvossa, niiden hyödyntämisessä potilaan oman endoteeli-descemettikudoksen aktivoimisessa ja endoteelisolujen in vitro- kasvatuksessa.

2. ROCK- SIGNALOINTI SARVEISKALVON ENDOTEELISOLUISSA

2.1 Sarveiskalvon endoteelin ja descemetin kalvon ominaisuudet

2.1.1 Sarveiskalvon endoteeli

Sarveiskalvon endoteelisolut ovat sarveiskalvon takaosan soluja, jotka kiinnittyvät strooman takapuolella sijaitsevaan descemetin kalvoon sen stroomaa vastakkaiselle puolelle (Sridhar 2018) (kuva 1). Ne muodostuvat alkionkehityksen aikana hermostopienen soluista yksisoluisiksi kerrokseksi, jolla on tärkeä tehtävä strooman nestetasapainon ylläpitämisessä (Sridhar 2018, de Oliveira ja Wilson, 2020, Ong ym. 2021, Price ym. 2021, Karri ja Chong, 2023). Strooman läpinäkyvyydelle on ratkaisevaa, että ylimääräinen neste pumpataan ulos, jotta kollageenisäikeet pysyvät järjestäytyneinä (Price ym. 2021). Siksi endoteelisolulla on kalvolla Na⁺/K⁺-ATPaasi- ionipumpuja (Natrium- kalium- ATPaasi), joiden avulla ylimääräinen neste saadaan pumpattua stroomasta kammionesteeseen (Sridhar 2018). Endoteelisolujen muodostama muuri kammionesteen ja strooman välillä vuotaa passiivisesti nestettä stroomaan (Bonanno 2012). Deturgesenssin, eli strooman dehydratoituneen tilan, saavuttamiseksi endoteelisolujen kalvoilla toimii monenlaisia ionikanavia, pumppuja ja transporttereita, jotka luovat gradienttieroja endoteelisolujen apikaalisen, eli kammionesteen, ja basolateraalisen, eli strooman, puolen välille. Ionien ja molekyylien kuljetus stroomasta kammionesteeseen vetää osmoottisesti vettä mukanaan. Tärkeitä vaikuttajia nesteen kuljetuksessa ovat bikarbonaatti, eli HCO₃⁻, ja laktaatti, joita kuljetetaan transendoteliallisesti kammionesteeseen. Laktaatin kuljetus vaatii samanaikaista HCO₃⁻ kuljetusta pH-erojen tasoittamiseksi. HCO₃⁻:n kuljetus taas kerryttää Na⁺:a solun sisään, joten Na⁺- ylimäärä tulee poistaa soluista basolateraalilla Na⁺/K⁺-ATPaasi- pumpuilla, jotka aktiivisesti ATP:n energialla pumppaavat 3 Na⁺- ionia solusta ulos ja 2 K⁺- ionia solun sisään. Na⁺/K⁺-ATPaasi- pumppujen inhibitio estää nestevirran ja aiheuttaa turvotusta stroomassa (Bonanno 2012). Morfologisesti endoteelisolut ovat heksagonaalisia ja niiden kalvolla on tiiviitä liitoksia, jotka muodostavat nesteen hallitsematonta läpäisyä estävän muurin (Sridhar 2018, Price ym. 2021). Solujen väliset tiiviit- ja vyöliitokset ylläpitävät apikaali-basaali polaarisuutta (Roy ym. 2015).

2.1.2 Descemetin kalvo

Descemetin kalvo on strooman puoleisesta poikkijuovaisesta kerroksesta sekä endoteelin puolen juovattomasta kerroksesta koostuva tyvikalvo, jonka komponentteja tuotetaan pääosin endoteeli-

soluista (Sridhar 2018, Price ym. 2021). Tyvikalvona ja endoteelisolujen tuottamana se tarjoaa endoteelisoluille hyvän kiinnittymisalustan (Sampaio ym. 2021). Elimistön muista tyvikalvoista poiketen descemetin kalvosta löytyy enemmän kollageeni VIII kuin kollageeni IV, joita kuitenkin molempia löytyy kalvon jokaisesta kerroksesta (de Oliveira ja Wilson, 2020). Muita descemetin kalvon, myös muista tyvikalvoista löytyviä, komponentteja ovat laminiinit, perlekaani ja nidogeenit sekä descemetin kalvolle ominaiset fibronektiini, dermataanisulfaatti ja kerataani (de Oliveira ja Wilson, 2020; Sampaio ym. 2021).

Descemetin kalvo luo molekyylien valikoivalle läpäisylle, endoteelisolujen ohella, tärkeän mekaanisen esteen (de Oliveira ja Wilson, 2020). Eläinmalleilla on todistettu, että TGF- β 1:n (eng. Transforming growth factor) sekä TGF- β 2:n kulkua stroomaan estetään sitomalla ne descemetin kalvon komponentteihin siten ehkäisten niiden välittämää keratosyyttien ja sarveiskalvon fibroblastien erilaistumista sarveiskalvoa sakeuttaviksi myofibroblasteiksi (de Oliveira ja Wilson, 2020, Sampaio ym. 2021). Malleissa descemetin kalvon vaurioituessa myös luuytimeistä kantautuvat fibroblastit pääsevät kulkeutumaan stroomaan ja kontaktissa TGF- β :n kanssa erilaistuvat myofibroblasteiksi (de Oliveira ja Wilson, 2020, Sampaio ym. 2021). Descemetin kalvo ja endoteelisolut luovat siis esteen kammionesteen ja strooman välille (Sampaio ym. 2021). Näiden kudosten poistaminen johtaa eläinmalleissa hetkelliseen arpeutumiseen sarveiskalvon fibroblastien erilaistuessa myofibroblasteiksi poistoalueella, mutta arpikudos häviää vähitellen descemetin kalvon ja endoteelin uusiutuessa (Sampaio ym. 2021). Vastaavaa arpeutumista on esiintynyt myös ihmispotilailla, mikä todennäköisesti perustuu samankaltaisiin mekanismeihin (Wilson 2019, Price ym. 2021).

2.1.3 Uusiutumiskyky

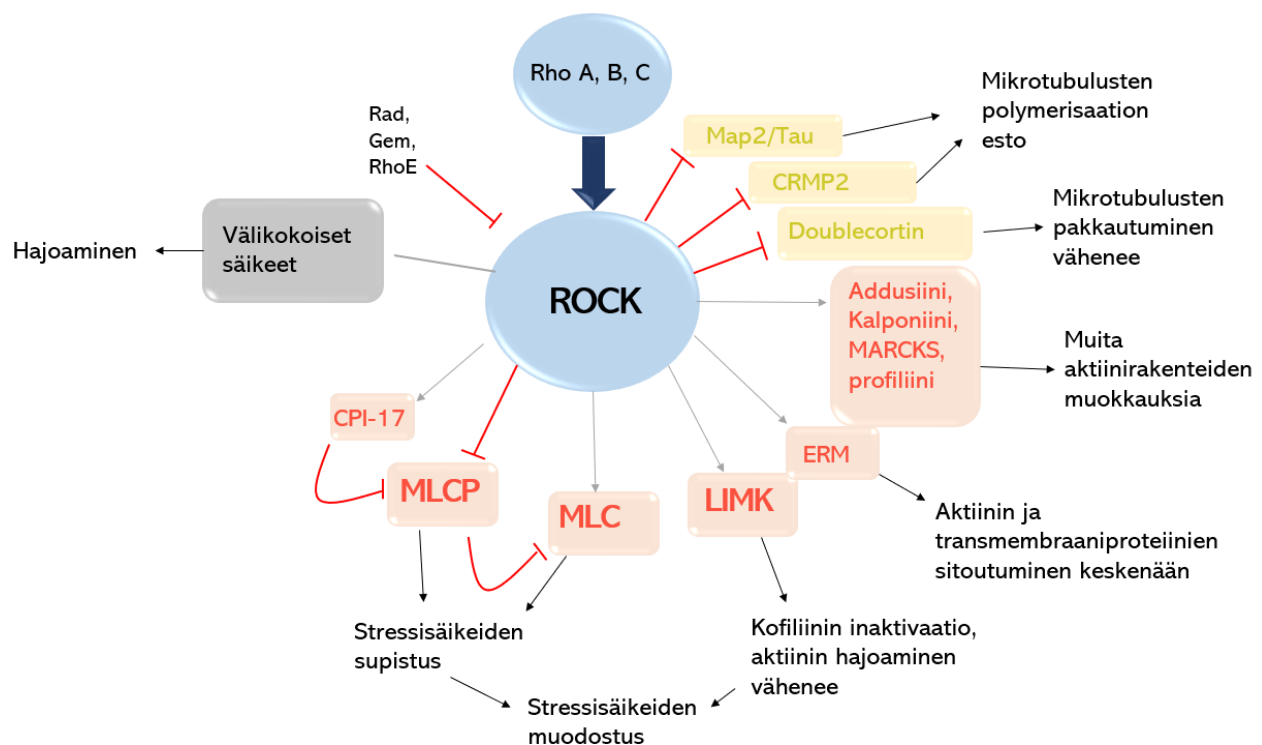
Sarveiskalvon endoteelisolut jakautuvat luonnostaan hyvin heikosti, sillä niiden solusykli on pysähtynyt G1- vaiheeseen (Moura-Coelho ym. 2019, Price ym. 2021, Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Tämän vuoksi endoteelin sairauksista, kuten Fuchsin dystrofiasta (FECD, eng. Fuchs' endothelial corneal dystrophy), tai silmäoperaatioista, kuten kaihileikkauksista, johtuvat endoteeliin kohdistuvat vauriot uhkaavat endoteelikerroksen toimintakykyä ja siten näkökykyvyn säilymistä (Moura-Coelho ym. 2019, Price ym. 2021). Fuchsin dystrofiaan palataan myöhemmin tarkemmin. Endoteelisolumäärä alkaa kuitenkin laskea myös iän myötä ollen syntymässä noin 3000–4000 solua/mm², ja laskien 30 ikävuoden jälkeen 0,6 % vuositahdilla, mikä voi aiheuttaa soluille koon ja muodon vaihteluja (Moura-Coelho ym. 2019, Sridhar 2018). Strooman läpinäkyvyyden ylläpitämiseksi kriittinen endoteelisolumäärän raja-arvo on 500 solua/mm² (Moura-Coelho ym. 2019). Endoteelisolujen jakautumisessa voi myös olla ikätyypillisiä eroja nuorten endoteelisolujen jakautuessa tehokkaammin (Sampaio ym. 2021).

Descemetin kalvon uusiutumiskyky riippuu vahvasti siihen kohdistuneen vaurion suuruudesta. Sen luonnollinen uusiutuminen on melko heikkoa ja on riippuvainen endoteelisolumäärästä. Jos endoteelisoluja on paljon pienen kalvovaurion alueella, uusiutuu vaurio pääsääntöisesti melko hyvin, kun taas, jos sarveiskalvosta poistetaan suuri osa endoteelisoluista ja descemetin kalvosta, on uusiutuminen paljon heikompa. On todistettu, että endoteelisolut vaikuttavat kalvon uusiutumiseen, sillä ne tuottavat eristettyinä in vitro- olosuhteissa descemetin kalvon kaltaista materiaalia. (de Oliveira ja Wilson, 2020) Kiistämättä endoteelisoluilla on siis vaikutusta kalvon uusiutumiseen, mutta Sampaio ym. osoittivat kanikokeilla, että kalvo uusiutuu osittain myös endoteelisolujen puutteessa (Sampaio ym. 2021). Heidän tutkimuksessaan kaneilta poistettiin descemetin kalvoa ja endoteelisoluja 8 mm säteellä ja seurattiin kudosten uusiutumista 6kk ajan. Kalvon muodostusta havaittiin jo ennen endoteelisolujen kulkeutumista poistoalueelle viitaten kalvon komponenttien tuottoon myös sarveiskalvon fibroblasteista stroomasta. Maturoituneen kalvon muodostuminen vaati kuitenkin endoteelisolujen läsnäoloa ja sen muodostuminen eteni perifeeraalisista osista keskiosaan endoteelisolujen liikkeen ja jakautumisen myötä. Vaikka kaniin endoteelisolut tyypillisesti jakautuvat tehokkaammin kuin ihmisten, eivätkä siten ole täysin verrattavissa ihmisen endoteelisoluihin, voidaan tämän tutkimuksen tuloksia hyödyntää descemetin kalvon uusiutumiseen vaikuttavien tekijöiden tutkimisessa (Sampaio ym. 2021).

2.2 Rho- kinaasi reitti

Rho- kinaasi eli ROCK on AGC- perheeseen kuuluva seriini/treoniini proteiinkinaasi, jonka ylävirran aktivaattorit kuuluvat Rac-yläluokan alaisiin Rho-GTPaaseihin. Tyypillisimpiä ROCK aktivaattoreita ovat RhoA, RhoB ja RhoC GTPaasit, joista erityisesti RhoA:n välittämä aktivaatio on hyvin tunnettu (Julian ja Olson, 2014, Guan ym. 2023) (Kuva 2). RhoGTPaaseihin kuuluu myös endogeenisiä ROCK- inhibiittoreita, kuten Gem, Rad ja RhoE, jotka estävät ROCK:n toimintaa. ROCK muokkaa solun tukirankaa eli mikrofilamentteja (aktiinifilamentit), mikrotubuluksia ja välikokoisia säikeitä sekä vaikuttaa geenien ilmentymiseen ja siten vaikuttaa esimerkiksi solun liikkumiseen, jakautumiseen, erilaistumiseen sekä apoptoosiin (Amano ym. 2010, Julian ja Olson, 2014, Guan ym. 2023). ROCK:n alavirtaan kuuluu lukuisia efektoreita, joiden vaikutuksista erityisen tunnettuja ovat aktiinitukirangan muokkaukset, jotka ovat yhteydessä aktiini-myosiini stressisäikeiden muodostumiseen ja supistumiseen sekä muihin aktiinia vaativien tapahtumien ja rakenteiden, kuten fokaaliadheesiot, syntyyn (Amano ym. 2010, Julian ja Olson, 2014, Guan ym. 2023, Kopecny ym. 2023). Fokaaliadheesiot, jotka ovat tärkeitä solun ja soluväliaineen välisissä liitoksissa, ovat kiinnittyneet stressisäikeisiin (Julian ja Olson, 2014). ROCK:lla on yli 30 efektoria, eikä kaikkia siihen liittyviä signaalintimolekyylejä edelleenkään tunneta täysin (Kopecny ym. 2023).

Koska ROCK on kinaasi, se välittää signaalia fosforylaatioilla. ROCK vaikuttaa stressisäikeiden supistumiseen fosforyloimalla myosiinin kevyttä ketjua (MLC, myosin light chain), inaktivoimalla myosiinin kevyen ketjun fosfataasia (MLCP, Myosin light chain phosphatase), joka muuten poistaisi myosiini II:n aktivoivan fosforylaation, sekä aktivoimalla MLCP-inhibiittoria CPI-17:ää (Amano ym. 2010, Julian ja Olson, 2014, Guan ym. 2023). Aktiinin- ja myosiininvälisellä stressisäikeiden supistuksella säädellään monia solun tapahtumia, kuten liikettä ja liitoksia muihin soluihin ja soluvälialueeseen, jakautumista ja apoptoosia (Amano ym. 2010, Julian ja Olson, 2014). Aktiinin hajoamista ehkäisee LIM kinaasin (LIMK) aktivaatio ja siten aktiinia hajottavan kofiliinin inaktivaatio (Julian ja Olson, 2014, Guan ym. 2023). Ezriini/radiksiini/moesiinin (ERM) fosforylaatio lisää aktiinin sitoutumista transmembraanisiin proteiineihin (Amano ym. 2010). ROCK:lla on myös lukuisia muita aktiinitukirankaan vaikuttavia kohteita, kuten addusiini, kalponiini, MARCKS ja profiiliini, mutta MLC, MLCP ja LIMK vaikutukset ovat parhaiten ymmärrettyjä (Amano ym. 2010, Kopečný ym. 2023). ROCK ei yksinään johda stressisäikeiden ja fokaaliadheesioiden muodostumiseen, mutta sitä kuitenkin vaaditaan tässä prosessissa (Amano ym. 2010). ROCK:n aktivoima stressisäikeiden supistus ja aktiinin stabiloiminen kofiliinin inhibitiolla vaikuttavat yhdessä Rho:n toisen efektorin, mDia:n, kanssa stressisäikeiden muodostumiseen (Amano ym. 2010).



Kuva 2. Rho-ROCK-signalointireitti. Rho A, B ja C kykenevät aktivoimaan ROCK:a, jonka tunnetuimpia efektoreita ovat stressisäikeiden supistumiseen vaikuttavat MLCP ja MLC. MLCP inhibiointi estää sen välittämää stressisäikeiden supistumisen inhibiittoria ja MLC aktivoituminen lisää stressisäikeiden aktivoivaa fosforylaatiota, joten ROCK aktiivisuus lisää stressisäikeiden supistumista. LIMK inaktivoi aktiinia hajottavaa kofiliinia eli stabiloi aktiinirakenteita. MLCP, MLC ja LIMK yhdessä vaikuttavat stressisäikeiden muodostukseen. Map2/Tau, CRMP2 ja Doublecortin ovat mikrotubuluksia stabiloivia mikrotubuluksiin liittyviä proteiineja, joten niiden inhibiointi ROCK-välitteisesti vähentää mikrotubulusten polymerisaatiota ja pakkautumista. Välikokoisten säikeiden fosforylaatiot hajottavat säikeitä. Rad, Gem ja RhoE ovat esimerkkejä endogeeni-

sesti ROCK:a inhiboivista molekyyleistä. ROCK:sta lähtevät harmaat nuolet kuvaavat aktivoivaa fosforylaatiota ja punaiset tylppäpäiset viivat efektorin toimintaa inhiboivaa fosforylaatiota. Mustat nuolet kuvaavat ketjun lopullista vaikutuskohdetta. Kaavio ei ole tyhjentävä kuvaus ROCK-signaloinnista, mutta tärkeimmät vaikuttajat on avattu. Punaisissa laatikoissa aktiiniin vaikuttavat efektorit, keltaisissa mikrotubuluksiin vaikuttavat efektorit ja harmaassa välikokoisiin säikeisiin vaikuttava fosforylaatio. Lyhenteet: ROCK = Rho- kinaasi, MLCP = myosiinin kevyen ketjun fosfataasi, MLC = myosiinin kevyt ketju, LIMK = LIM kinaasi, CRMP = kollapsiinin vasteproteiini 2. (Koottu lähteistä Amano ym. 2010, Guan ym. 2023, Julian ja Olson, 2014).

Mikrotubuluksiin ROCK vaikuttaa lähinnä epävakauttavasti mikrotubuluksiin liittyvien proteiinien fosforylaatioilla (Guan ym. 2023). MAP2/Tau ja kollapsiinin vasteproteiini 2 (CRMP2, collapse response mediator protein 2) fosforylaatiot estävät mikrotubulusten kasvua (Amano ym. 2010). Doublecortinin fosforylaatio estää mikrotubulusten pakkautumista (Amano ym. 2010, Guan ym. 2023). Vastaavasti myös välikokoisten säikeiden fosforylaatiot ovat hajottavia, millä on merkitystä esimerkiksi ROCK- välitteisessä välikokoisten säikeiden hajotuksessa tytärsolujen välistä sytokineesissä (Amano ym. 2010).

Ihmisiltä löytyy kaksi ROCK:n homologia, ROCK I ja ROCK II, joista molemmilla on aktiivisuutta silmässä (Syed ja Rapuano, 2021, Kopecny ym. 2023). ROCK I ja ROCK II hyvin homologisista kinaasidomeeneista huolimatta voivat niiden tehtävät soluissa poiketa jonkin verran, mutta koska ROCK- signalointiin sarveiskalvon endoteelissa liittyvä informaatio on saatu lähinnä molempia homologeja inhiboivista ROCK- inhibiittoreista, ei homologien välisiä eroja endoteelisoluissa ole kirjallisuudessa juuri eritelty (Moura-Coelho ym. 2019, Kopecny ym. 2023). ROCK- signaloinnilla, ja homologeilla, on myös solutyypillisiä aktiivisuuseroja ja signalointi voikin joissain soluissa johtaa apoptoosiin, kun taas toisissa ehkäistä sitä (Ong ym. 2021). Solunjakautumisprosessissa ROCK II johtaa sytokineesin vaatiman aktiini-myosiinisupistusrenkaan supistumiseen, mutta tämä mekanismi ei nojaa yksinään ROCK- aktiivisuuteen ja siksi jakautumista tapahtuu myös ROCK- inhibiti-
ossa. (Julian ja Olson, 2014)

ROCK-signalointi vaikuttaa tukirangan ohella myös solusyklin säätelyyn ja erilaistumiseen geenien ilmentymisen kautta (Ong ym. 2021). Sarveiskalvon endoteelisoluissa ROCK- signaloinnin yksi merkittävistä vaikutuskohteista on sykliini D ja p27 säätely, mikä rajoittaa solujen G1/S siirtymää solusykliissä ja siten jakautumista (Moura-Coelho ym. 2019, Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Endoteelisolut eivät normaalisti juurikaan jakaudu aikuisuudessa (Sridhar 2018). ROCK- signalointi myös vahvistaa endoteelisoluissa aktiinista riippuvaisten stressisäikeiden, fokaaliadheesioiden ja tiiviiden liitosten muodostumista ja siten lisää solujen adheesiota toisiinsa ja soluväliaineeseen (Moura-Coelho ym. 2019). Endoteelisoluille on tyypillistä hajota hilseilyn sijaan apoptoosilla, mihin osallistuvat ROCK- signaalivälitteiset apoptoottiset prosessit, kuten tuman hajoaminen ja solukalvon rakkuloituminen (Syed ja Rapuano, 2021, Kopecny ym. 2023).

2.3 ROCK- inhibitio sarveiskalvon endoteelisoluissa

ROCK- signalointia on tutkittu paljon ROCK- inhibiittoreilla, joten inhibiittoreihin liittyvät vaikutukset ovat monin tavoin tunnettuja ROCK- signaloinnin vaikutuksia vastakkaiset (Moura-Coelho ym. 2019). ROCK- signaloinnin inhibitio siis vähentää stressisäikeiden muodostumista ja supistumista sekä fokaaliadheesioiden ja tiiviiden liitosten muodostumista (Moura-Coelho ym. 2019). Sarveiskalvon endoteelisoluissa ROCK- inhibition hyödyntämisellä on suuria mahdollisuuksia erityisesti solunjakautumiseen liittyvien vaikutusten vuoksi. ROCK- inhibiittoreilla on saatu tehostettua solusyklin G1/S siirtymää endoteelisoluissa ja vähennettyä apoptoottista aktiivisuutta, mikä on johtanut solujen lisääntyneeseen jakautumisaktiivisuuteen, vaikkakin lähinnä tapauksissa, joissa on samanaikaisesti jokin endoteelin sairaus tai vaurio (Moura-Coelho ym. 2019, Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Lisääntynyt Ki67- proteiinin ilmentyminen on merkki aktiivisemmasta solujen jakautumisesta (Syed ja Rapuano, 2021, Kopecny ym. 2023). Vaikka ROCK- inhibiittorit vähentävät adheesiota edistävien fokaaliadheesioiden ja tiiviiden liitosten muodostumista, ne haarauttavat solukalvon supistavaa aktiinitukirankaa siten, että solu pääsee levittäytymään paremmin ja lisäämään kalvon kontaktipintaa ympäristönsä kanssa (Julian ja Olson, 2014, Moura-Coelho ym. 2019, Shin ym. 2023). Lopullinen vaikutus on siis adheesio- ja solun liikkumisen tehostuminen ROCK- inhibiittoreilla (Karri ja Chong, 2023). Solun liikkuminen vaatii adheesioiden hajoamista ja uusien muodostumista sekä aktiinitukirangan uudelleenjärjestäytymistä solukalvolla, joten ROCK- inhibiittoreilla voidaan saavuttaa tehokkaampi solun liike ympäristössään (Kopecny ym. 2023). Solun liikkeessä keskiössä on ROCK- ja Rac- signalointiin liittyvä polarisaatio (Amano ym. 2010). Rac vaikuttaa solukalvon ulokkeiden muodostumiseen solun etuosassa etenemissuuntaan ja ROCK huolehtii solua työntävästä supistuksesta solun takaosassa. Polarisaatioon vaikuttaa ROCK:n välittämä Rac- inhibitio solun takaosassa, minkä vuoksi ulokkeet muodostuvat pääasiassa solun etenemissuuntaan. ROCK- inhibitio kuitenkin häiritsee tätä mekanismia, jolloin ulokkeita muodostetaan myös muualta kuin solun etuosasta (Amano ym. 2010).

ROCK- inhibiittorit lisäävät endoteelisoluissa Na⁺/K⁺-ATPaasi-pumppujen tuotantoa, mikä johtaa parantuneeseen neste-poistoon stroomasta, sekä ehkäisevät erilaistumista mesenkymaalisoluiksi (Moura-Coelho ym. 2019). Endoteelisolujen erilaistuminen mesenkymaalisoluiksi eli EndMT (eng. Endothelial-to-mesenchymal transition) on prosessi, jossa endoteelisolut menettävät solutyyppillisiä piirteitään ja muuttuvat enemmän fibroblasteja muistuttavaan suuntaan (Roy ym. 2015). Solujen välinen kontakti ja kontakti-inhibitio on tärkeää EndMT:n ehkäisyssä ja siksi endoteelisolumäärän laskut tai harvaan siirrostetut solut soluviljelmissä ovatkin suuri riski EndMT:n kehittymiselle (Roy ym. 2015). EndMT:n voivat laukaista TGF- β ja FGF-2 sytokiinit, jotka eivät kuitenkaan häiritse tiiviissä kontaktissa eläviä soluja, mikä on kriittistä endoteelisolujen normaalille fenotypille, sillä ne ovat suoraan kontaktissa kammionesteen TGF- β :n kanssa (Peh ym. 2023;

Roy ym. 2015). ROCK- inhibiittorin, netarsudiilin, on todistettu estävän TGF- β :n välittämää fibroblasteille tyypillisten ominaisuuksien kehittymistä ihmisen trabekkelivyöhykkeen soluissa (Lin ym. 2018). Netarsudiiliin ja sen ominaisuuksiin palataan kuitenkin myöhemmin tarkemmin.

TGF- β 2, joka on runsain TGF- β :n isoformi kammionesteessä, vaikuttaa endoteelisoluissa jakautumista hillitsevästi ja liikettä lisäävästi. FGF-2 lisää endoteelisolujen jakautumista vähentämällä solujakautumista estävää p27:ta sekä lisäämällä solujakautumista edistävän β -kateniinin tuotantoa. Se myös edistää solujen liikkumista ja inaktivoi Rho:ta. Indikaattorina EndMT:n kehittymiselle voidaan pitää α -SMA:ta, sillä TGF- β aktivoi sen tuotantoa EndMT:ssä. ROCK- inhibiittoreilla on mahdollisuus ehkäistä EndMT:tä, sillä ne nopeuttavat solujen jakautumista ja solujen välisten liitosten syntyä ja siten kontakti-inhibition syntyä. (Roy ym. 2015) Okumura ym. suorittamissa kokeissa kaneilla tutkittiin ROCK- inhibiittorin vaikutuksia endoteelisoluijeksiin yhteydessä (Okumura ym. 2012). Y-27632:n käyttö ehkäisi α -SMA:n tuotantoa ja tuotantoa havaittiinkin vain verrokkiryhmän soluissa, joiden fenotyyppi ei myöskään vastannut tavoiteltua endoteelisolujen heksagonaalista muotoa (Okumura ym. 2015). TGF- β :lla on myös todettu olevan yhteyttä ROCK- signalointiin epiteelisoluissa EndMT:tä vastaavassa prosessissa, EMT:ssä (eng. epithelial-to-mesenchymal transition), jossa TGF- β 1 voi aktivoida stressisäikeiden muodostusta ja MLC:n fosforylaation kautta α -SMA:n tuotantoa Rho-ROCK- välitteisesti (Roy ym. 2015). Epiteelisolujen ja endoteelisolujen ominaisuudet eroavat kuitenkin jonkin verran, minkä vuoksi TGF- β :n ja ROCK- signaloinnin yhteys voi erota näissä solutyypeissä (Roy ym. 2015).

2.3.1 Myyntiluvalliset ROCK- inhibiittorit ja ROCK- homologiaffiniteetit

ROCK inhiboivia molekyylejä on kehitetty jopa yli 170, mutta osa inhibiittoreista on tutkimuksissa saanut suurempaa painoarvoa (Guan ym. 2023, Kopecny ym. 2023). Näitä ovat pyridiini-*siamidi* Y-27632 sekä isokinoliinit ripasudiili (K-115), netarsudiili (AR-13324) ja netarsudiilin aktiivinen metaboliitti (AR-13503) (Kopecny ym. 2023, Peh ym. 2023) (Taulukko 1). Myyntiluvallisia ROCK- inhibiittoreita löytyy tällä hetkellä glaukoomaan ripasudiili ja netarsudiili, aivoverisuonten vasospasmeihin fasudiili, jonka vaikutuksia sarveiskalvon endoteeliin on tutkittu vähemmän, sekä käänteishyljintään belumosudiili, joka ei ole käytössä silmän lääkinnässä (Karri ja Chong, 2023, Roskoski 2024). ROCK- inhibiittorien vaikutus glaukoomassa perustuu aktiivirakenteiden rentouttamiseen ja vähentämiseen trabekkelivyöhykkeen ja Schlemmin kanavan soluissa, jolloin kammionesteen ulosvirtaus tehostuu (Moura-Coelho ym. 2019, Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Sarveiskalvon esteraasit muuttavat topikaalisesti, eli silmän pinnalle, annostellun netarsudiilin aktiiviseksi metaboliitiksi sen kulkeutuessa sarveiskalvon läpi kammionesteeseen (Lin ym. 2018). Vaikka sekä ripasudiiliin että netarsudiiliin virallinen käyttöindikaatio on glaukooma, on molemmilla havaittu apua endoteelisairauksien hoidossa (Syed ja Rapuano, 2021). Niillä ei kuitenkaan

ole juurikaan vaikutusta solumääriin potilailla, joilla ei ennestään esiinny endoteelivauriota, pienentäen riskiä liialliseen endoteelisolumäärän kasvuun potilailla, joilla vaurioita ei esiinny. Solumäärät eivät siis merkittävästi kasva potilailla, jotka käyttävät ripasudiilia tai netarsudiilia nimenomaan glaukooman hoitoon. Ripasudiilin ja netarsudiilin käytöstä voi kuitenkin aiheutua solukkoon valearakkuloita (pseudoguttae), jotka häviävät käytön lopetuksen myötä (Syed ja Rapuano, 2021). Y-27632:lla on ollut ensimmäinen ROCK- inhibiittori, jolla on havaittu vaikutuksia endoteelisoluihin, kun sen havaittiin käynnistävän solusyklin G1/S siirtymää sykliini D:n tuotannolla ja p27-tuotannon vähenemisellä (Kopecny ym. 2023). Y-27632 oli myös ensimmäisiä ROCK- inhibiittoreita, joilla havaittiin sarveiskalvon kirkastumista sarveiskalvon endoteelia rappeuttavaa FECD:tä sairastavien potilaiden käytössä (Syed ja Rapuano, 2021). Netarsudiili inhiboi ROCK:n lisäksi noradrenaliinitransportteria vähentäen noradrenaliinin takaisinottoa ja siten lisäten vasokonstriktiota eli verisuonten supistumista (Lin ym. 2018). Tässä tutkielmassa käsitellään lähinnä Y-27632:a, ripasudiilia sekä netarsudiilia ja sen aktiivista metaboliittia, sillä näiden vaikutuksia endoteeliin on tutkittu laajemmin (Karri ja Chong, 2023).

Taulukko 1. Netarsudiilin, Ripasudiilin ja Y-27632:n ominaisuuksia. *= Pubmed antaa 43 tulosta hakusanoilla Y-27632 AND corneal endothelium, 24 tulosta hakusanoilla Ripasudil AND corneal endothelium ja 12 tulosta hakusanoilla Netarsudil AND corneal endothelium. **= Pubmed antaa 3039 tulosta hakusanalla Y-27632, 213 tulosta hakusanalla Ripasudil ja 168 tulosta hakusanalla Netarsudil (mukana myös tutkimukset, jotka eivät käsittele sarveiskalvon endoteelia).

ROCK-inhibiittori	Rakenne	Lääkeryhmä	Kaupallinen käyttöaihe ja pitoisuus	Optimaalipitoisuus soluviljelmässä	Kokemus endoteelivaurioiden hoidossa
Netarsudiili	Isokinoliini (Peh ym. 2023)	ROCK- ja noradrenaliinitransportterin estäjä (Karri ja Chong 2023)	Glaukooma, 0,02 % (Karri ja Chong 2023)	100 nM – 1 µM (Peh ym. 2023)	Lupaava tehokkuus affiniteetin perusteella sekä käyttökävyys vain kerran vuorokaudessa annostuksella (Karri ja Chong 2023). Y-27632:ta ja ripasudiilia vähemmän kokemusta endoteelivaikutuksista*.
Ripasudiili	Isokinoliini (Peh ym. 2023)	ROCK-Inhibiittori (Karri ja Chong 2023)	Glaukooma, 0,4 % (Karri ja Chong 2023)	30 µM (Peh ym. 2023)	Netarsudiilia enemmän kokemusta leikkauskirurgian yhteydessä (Karri ja Chong 2023).
Y-27632	Pyridiini-karboksi-amidi (Peh ym. 2023)	ROCK-Inhibiittori (Karri ja Chong 2023)	Ei kaupallisessa käytössä (Karri ja Chong 2023)	10µM (Peh ym. 2023)	Ensimmäinen ROCK- inhibiittori, jolta havaittu endoteelivaikutuksia (Karri ja Chong 2023) ja myös eniten tutkituin**. Ensimmäisiä ROCK- inhibiittoreita, jota hyödynnetty endoteelivaurioiden hoidossa ihmisillä (Syed ja Rapuano 2021).

Lähes kaikki silmän alueen tutkimuksissa hyödynnetyt ROCK- inhibiittorit inhiboivat sekä ROCK I-että ROCK II- homologeja, mutta eri affiniteeteilla (Moura-Coelho ym. 2019, Kopecny ym. 2023). Kirjallisuudesta löytyvät arvot netarsudiilin ja Y-27632:n Ki- arvoille sekä ripasudiilin IC50- arvolle (Moura-Coelho ym. 2019) (Taulukko 2). Ki kertoo inhibiittorin pitoisuuden, jolla puolet entsyymeistä

sitovat inhibiittoria, kun taas IC50 kuvaa inhibiittorin pitoisuutta, jolla reaktionopeus on puolet maksimista. Mitä pienempi arvo, sitä tehokkaampaa sitoutuminen on. Ki kuvaa lähinnä inhibiittorin affiniteettia entsyymiin ja IC50 taas inhibiittorin reaktiokineettisiä ominaisuuksia, eikä arvoja siksi voida suoraan verrata keskenään. Reaktio-olosuhteissa voi myös olla eroja, mikä vaikuttaa tuloksiin. Tulokset kuitenkin antavat suuntaa affiniteettien eroista.

Ishizaki ym. työryhmineen määrittivät kokeillaan, inkuboimalla kinaasipuskurissa keskenään ROCK- inhibiittoria ja soluista eristettyjä ROCK- homologeja, Y-27632:n Ki- arvoiksi ROCK I kohden 0,22 μM ja ROCK II kohden 0,3 μM , mikä viittaa inhibiittorin korkeampaan affiniteettiin ROCK I kohtaan (Ishizaki ym. 2000). Lin ym. tutkimuksissa mitattiin netarsudiilin Ki- arvoiksi sekä ROCK I että ROCK II kohden 1 nM eli affiniteetit ovat vastaavia molempia homologeja kohtaan, mutta netarsudiilin aktiivisen metaboliitin affiniteetit voivat olla jopa viisinkertaisia (Lin ym. 2018). Lin ym. mittasivat Ki-arvot myös Y-27632:lle poiketen huomattavasti Ishizaki ym. suorittaman kokeen tuloksista arvoilla 22 nM ROCK I kohden ja 41 nM ROCK II kohden, mikä korostaa koeolosuhteiden vaikutusta tuloksiin (Ishizaki ym. 2000, Lin ym. 2018). Tämä koe tehtiin kaupallisella kinaasiaktiivisuutta määrittävällä kitillä, hyödyntäen erikseen tilattuja ROCK- homologeja ja ROCK- inhibiittoria, ja olosuhteet olivat samanlaiset sekä netarsudiililla että Y-27632:lla, joten kokeella on ainakin todistettu netarsudiilin ja sen aktiivisen metaboliitin parempi affiniteetti ROCK:n homologieihin Y-27632 verrattuna (Lin ym. 2018).

Ripasudiilin IC50- arvoiksi Isobe ym. saivat tutkimuksissaan 19 nM ROCK I kohden ja 51 nM ROCK II kohden, mutta affiniteettia homologieihin ei näiden arvojen perusteella voida vertailla (Isobe ym. 2014). Tuloksen perusteella ripasudiili inhiboi tehokkaammin ROCK I välittämää reaktiota. Tutkijat syntetisoivat itse kokeessa käyttämänsä ripasudiilin, jota he inkuboivat Tris-HCl puskurissa erikseen tilattujen ROCK I- ja ROCK II- homologien kanssa (Isobe ym. 2014). Myyntiluvallisissa netarsudiilia sisältävissä glaukoomalääkkeissä ROCK- inhibiittorin pitoisuus on 0,02 % ja ripasudiilia sisältävissä 0,4 %, mikä voi viitata netarsudiilin parempaan affiniteettiin, sillä lääkeainetta on tarvittu valmisteeseen pienempi määrä (Price ym. 2021, Karri ja Chong, 2023). Pitoisuusero voi kuitenkin johtua monesta muustakin tekijästä, kuten lääkkeen muista sitoutumispaikoista ROCK- homologien lisäksi, jolloin lääkettä menee ikään kuin ”hukkaan”, eri ROCK- aktivoivien molekyylien estosta tai erilaisista sivuvaikutusprofiileista (Karri ja Chong, 2023).

Taulukko 2. Taulukko eri ROCK- inhibiittorien ominaisuuksista in vitro ROCK- inhibiittorin ja ROCK-homologien inkubaatiossa. (*IC₅₀ arvo kuvaa reaktiokineettisiä ominaisuuksia, eikä suoraan kerro inhibiittorin affiniteettiä. Voidaan kuitenkin päätellä, että inhibiittori tässä tapauksessa inhiboi tehokkaammin ROCK I välittämää entsyymireaktiota.)

Julkaisut	Käytetty ROCK-inhibiittori	IC ₅₀ /K _i	ROCK I	ROCK II	Korkeampi affiniteetti
Ishizaki ym. 2000	Y- 27632	K _i	0,22 µM	0,3 µM	ROCK I
Lin ym. 2018	Netarsudiili	K _i	1 nM	1 nM	Yhtä suuri
Lin ym. 2018	AR-13503	K _i	0,2 nM	0,2 nM	Yhtä suuri
Lin ym. 2018	Y-27632	K _i	22 nM	41 nM	ROCK I
Isobe ym. 2014	Ripasudiili	IC ₅₀	19 nM	51 nM	ROCK I*

Peh ym. ROCK- inhibiittoreita vertailevassa tutkimuksessa, in silico, havaittiin kaikkien 46 tutkimukseen sisällytetyn ROCK- inhibiittorin sitoutuvan ROCK I- ja II- homologeihin tehokkaammin kuin Y-27632:n. Monet näistä, mukaan lukien netarsudiili, netarsudiilin aktiivinen metaboliitti sekä ripasudiili, sitoutuivat ROCK I- homologiaan merkittävästi tehokkaammin kuin Y-27632 (Taulukko 3). Yhteneväistä edellä mainituilla inhibiittoreilla oli, että kaikki sitoutuivat tehokkaammin homologiaan II kuin homologiaan I. Netarsudiilin sekä AR-13503:n affiniteetit ROCK II- homologiaan ylittivät kaikki muut ehdokkaat. ROCK I- sitoutumisessa vahvuus tehokkaimmasta vähiten tehokkaaseen oli AR-13503, AR-13324, K-115 ja Y-27632 sekä ROCK II- sitoutumisessa AR-13324, AR-13503, K-115 ja Y-27632. Netarsudiilin aktiivisen metaboliitin affiniteetti netarsudiiliin verrattuna on siis korkeampi vain ROCK I- homologille, mutta ei ROCK II- homologille. (Peh ym. 2023)

Taulukko 3. Peh ym. tutkimuksen mukaiset affiniteettierot ROCK I ja ROCK II välillä sekä ristiriidat muiden ilmoitettujen affiniteettien välillä (Peh ym. 2023).

	Netarsudiili	AR-13503	Ripasudiili	Y-27632
Korkeampi affiniteetti (ROCK I / ROCK II)	ROCK II	ROCK II	ROCK II	ROCK II
ROCK I affiniteetit järjestyksessä (1=korkein, 4=heikoin)	2	1	3	4
ROCK II affiniteetit järjestyksessä (1=korkein, 4=heikoin)	1	2	3	4
Ristiriita	Lin ym. tutkimuksissa ROCK I ja ROCK II affiniteetit yhtä suuret (Lin ym. 2018)	Lin ym. tutkimuksissa ROCK I ja ROCK II affiniteetit yhtä suuret (Lin ym. 2018)		Ishizaki ym. ja Lin ym. tutkimuksissa ROCK I affiniteetti suurempi (Ishizaki ym. 2000, Lin ym. 2018)

Tulokset ovat osittain ristiriidassa Ishizaki ym. ja Lin ym. työryhmien ilmoittamien Ki- arvojen kanssa, sillä Ishizaki ym. saivat tutkimuksissaan Y-27632:lle korkeamman affiniteetin ROCK I kohden kuin ROCK II kohden, kun taas Peh ym. tutkimuksissa saadut tulokset osoittivat päinvastaista (Ishizaki ym. 2000, Peh ym. 2023). Lin ym. kokeet osoittivat saman ristiriidan Y-27632 arvoissa sekä lisäksi netarsudiilin ja AR-13503, joiden suhteen ilmoittivat yhtä suuren affiniteetin homologiin, kun taas Peh ym. työryhmineen päätyivät molemmissa korkeampaan ROCK II affiniteettiin (Lin ym. 2018, Peh ym. 2023). On hyvä ottaa huomioon, etteivät Peh ym. tehneet tämän suhteen kokeellista analyysia vaan tulokset ovat peräisin in silico- analyysistä eivätkä siis kerro, kuinka koeolosuhteet in vitro tai in vivo vaikuttaisivat affiniteetteihin (Peh ym. 2023).

Täsmällisen tiedon saavuttamiseksi olisi siis eduksi, jos Ki- arvot kullekin ROCK- inhibiittorille AR-13503:lle, AR-13324:lle, K-115:lle ja Y-27632:lle määritettäisiin standardoiduissa olosuhteissa huomioiden olosuhteet sarveiskalvon endoteelisoluissa. Yhteneväistä tuloksissa kuitenkin oli netarsudiilin ja AR-13503:n tehokkaampi sitoutuminen kumpaankin homologiin verrattuna Y-27632:n (Ishizaki ym. 2000, Lin ym. 2018, Peh ym. 2023). Netarsudiilin vaikutukset aktiinitukirankaan ovat myös tehokkaammat kuin Y-27632:n, eikä Y-27632 välttämättä ole siis muita inhibiittoreita otollisempi vaihtoehto vaan on vain vakiintunut käytössä, sillä sen vaikutukset on löydetty ensimmäisenä (Moura-Coelho ym. 2019, Kopecny ym. 2023). Peh ym. tutkimusten tulokset, joihin Ishizaki ym., Lin ym. ja Isobe ym. työryhmineen eivät ottaneet kantaa, olivat ripasudiilin sekä homologin I että II affiniteetin sijoittuminen netarsudiilin ja AR-13503:n sekä Y-27632:n väliin eli puhtaasti affiniteettien perusteella tehokkaimmat olisivat netarsudiili ja AR-13503, toisena ripasudiili ja viimeisenä Y-27632 (Peh ym. 2023).

2.3.2 Netarsudiilin ja ripasudiilin lääkemuodot

Silmän lääkintä on sen rakenteen puolesta haastavaa ja antotapa valitaankin sen mukaan, mikä on lääkkeen tavoiteltu lopullinen kohde. Topikaaliset silmälääkkeet annostellaan silmän pintaan ja kulkeutuminen kammionesteeseen tapahtuu sarveiskalvon lävitse. Suuri osa lääkkeestä kuitenkin menee hukkaan, jopa yli 95 %, valumalla, laimenemalla kyynelneesteeseen tai kulkeutumalla kyynelkanavien kautta nieluun ja siten verenkiertoon sekä imeytymällä sidekalvoon. Topikaalisilla lääkkeillä voidaan lääkitä silmän etuosan rakenteita, mutta silmänpohjaan topikaalisesti annosteltu lääke ei pääse diffundoitumaan ja sen vuoksi vaatii erilaisia lääkkeen annostelumekanismia, kuten injektioita tai systeemistä (verenkierron kautta tapahtuvaa) lääkintää. (Ahmed ym. 2023) Systeemistenkin lääkitysten hyötyosuus jää kuitenkin alhaiseksi veri-kammioneste-esteen ja veri-verkkokalvoesteen vuoksi ja on siksi melko vähän käytetty annostelureitti silmän sairauksissa (Gaudana ym. 2010).

Suurin osa käytössä olevista silmän lääkityksistä on topikaalisia paremman käyttömukavuuden vuoksi injektioihin verrattuna (Ahmed ym. 2023). Lääkkeiden verenkiertoon imeytymisen vuoksi voivat ne aiheuttaa systeemisiä haittavaikutuksia, mikä tulee ottaa huomioon silmlääkkeitä kehitettäessä (Ahmed ym. 2023, Karri ja Chong, 2023). Lääkkeellä on imeytymisen kannalta edullista olla sekä lipofiilistä että hydrofiilistä ominaisuutta, sillä epiteelin läpäisy vaatii lääkkeeltä lipofiilisyyttä ja strooman läpäisy hydrofiilisyyttä (Gaudana ym. 2010, Ahmed ym. 2023). Suurimmat esteet sarveiskalvon läpi imeytymisessä koostuvatkin näistä kerroksista (Gaudana ym. 2010). Lipofiilisten lääkkeiden kuljetusta voidaan avustaa esimerkiksi miselliin kapseloimisella tai emulsiolla, jossa on hyödynnetty pinta-aktiivisia aineita (Ahmed ym. 2023). Imeytymisen tehostamiseksi lääkkeet voidaan muuttaa aihiolääkkeiksi, kuten netarsudiilin tapauksessa (Lin ym. 2018). Netarsudiili on huomattavasti rasvaliukoisempi, $\log P = 3.77$, kuin sen aktiivinen metaboliitti, $\log P = 1.19$ (<https://go.drugbank.com/drugs/DB13931>, Drugbank, haettu 9.1.2024, <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET02043>, Drugbank, haettu 9.1.2024). $\log P$ -arvo 0 kuvaa yhtä suurta hydro- ja lipofiilisyyttä ja arvon suurentuessa lipofiilisyyks kasvaa. Netarsudiili ei itse ole välttämättä muita ROCK-inhibiittoreita tehokkaampi vaihtoehto, mutta se metaboloituu sarveiskalvon esteeraasien avulla huomattavasti tehokkaammaksi metaboliitiksi, joka ei alhaisemman lipofiilisyytensä vuoksi imeytyisi yhtä hyvin kuin aihiolääke netarsudiili (Lin ym. 2018). Netarsudiilin muuntuminen hydrofiilisemmäksi stroomassa on edullista sen etenemiselle, sillä strooma läpäisee paremmin hydrofiilisiä molekyylejä (Gaudana ym. 2010).

Ripasudiilin myyntiluvallista lääkevalmistetta, 0,4 % vahvuudella, käytetään tyypillisesti kahdesti päivässä ja netarsudiilin valmistetta, 0,02 % vahvuudella, kerran päivässä. Valmisteen ovat silmätippoja ja annostelu on siis topikaalista (Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Ripasudiilin yleisiä haittavaikutuksia ovat sidekalvon verekkyyks, silmäluomen tulehdus ja sidekalvontulehdus, mutta lääkkeen käytön lopettamiseen johtavista syistä yleisimpiä ovat silmäluomen tulehdus, punaisuus ja kutina (Karri ja Chong, 2023). Sekä ripasudiililla että netarsudiililla yleisin haittavaikutus on sidekalvon verekkyyks, vaikkakin se koetaan haitallisempänä ripasudiilin käyttäjien keskuudessa liittyen mahdollisesti ripasudiilin tiheämpään annosteluun. Netarsudiililla on havaittu ripasudiilia enemmän haittavaikutuksia sarveiskalvon epiteeliin. Sen kationinen ja amfifiilinen, eli hydro- ja lipofiilisyyttä omaava, luonne voi johtaa epiteelisolujen fosfolipidien kertymiseen lysosomaalisesti ja siten aiheuttaa sarveiskalvon kiehkuraisuutta (cornea verticillata). Toinen ripasudiilin haittavaikutusprofiilista poikkeava netarsudiilin haittavaikutus on verkkomaisen epiteelin ödeeman (reticular epithelial edema) muodostuminen, jonka on ajateltu johtuvan epiteelin tiiviiden liitosten häiritsemisestä (Karri ja Chong, 2023). Lääkkeiden tulee läpäistä sarveiskalvon epiteeli päästäkseen kamionesteeseen, joten epiteelin toimintojen häiritseminen voi vaikuttaa imeytymiseen (Ahmed ym. 2023). Kaikkiaan valmisteiden sivuvaikutukset ovat pääosin lieviä ja harvoin johtavat lääkkeen käytön lopettamiseen (Karri ja Chong, 2023).

3. ENDOTEELIVAURIOIDEN HOITO ROCK- INHIBIITTORIAVUSTEISESTI

Endoteelivaurioiden yleisimpiä syitä ovat mekaaniset vauriot leikkausten ja operaatioiden yhteydessä, kuten kaihileikkauksessa, tai infektiot ja sairaudet, kuten FECD. Näiden stressitekijöiden aiheuttama endoteelisolujen määrän lasku ja toimintakyvyn häiriintyminen voi johtaa puutteelliseen nesteenoistoon stroomasta, jolloin kehittyy turvotusta eli ödeemaa sameuttaen sarveiskalvoa. Turvotus voi hoitamattomana johtaa sarveiskalvon epiteeliä rakkuloittavaan rakkulaiseen sarveiskalvosairauteen. (Price ym. 2021) Seuraavassa kappaleessa keskitytään tarkastelemaan ROCK-inhibiittorien käyttöä FECD:ssä, sillä se on yksi merkittävimpiä endoteelia vaurioittavia sairauksia (Syed ja Rapuano, 2021). FECD:tä myös usein hoidetaan descemetin kalvoa ja endoteelia poistavilla toimenpiteillä, jotka vaativat uuden descemetin kalvon ja endoteelisolukon muodostumista tai vaeltamista alueelle (Syed ja Rapuano, 2021). Palautuminen voi luonnostaan olla hidasta ja epävarmaa heikentäen potilaan elämänlaatua (Davies ym. 2021, Syed ja Rapuano, 2021). Leikkauksen jälkihoitoon voidaan yhdistää ROCK- inhibiittori ja siten tutkia sen vaikutuksia kudosten palautumiseen (Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023) (Taulukko 4). Lisäksi ROCK- inhibiittoreilla on mahdollisuuksia kasvattaa soluviljelmiin pohjaavien hoitokeinojen onnistumismahdollisuutta (Moura-Coelho ym. 2019).

Taulukko 4. Tyypillisesti käytettyjä ROCK- inhibiittoreita tietyissä endoteelia muokkaavissa käyttökohteissa. DWEK/DSO = Sarveiskalvon vaurioitunutta endoteelia ja descemetin kalvoa poistava toimenpide.

Käyttökohte	Vaikutustapa	Käytetyt ROCK- inhibiittorit
DWEK/DSO	Nopeampi palautuminen ja strooman turvotuksen lievittyminen	Ripasudiili, netarsudiili (Karri ja Chong 2023)
Pelastusterapia	Leikkauksesta johtuvan turvotuksen lasku	Ripasudiili, netarsudiili, Y-27632 (Moura-Coelho ym. 2019, Davies ym. 2021, Syed ja Rapuano 2021)
Solujen injektio	Solujen kiinnittyminen descemetin kalvoon	Y-27632 (Kinoshita ym. 2018)
Kaihileikkaus tai muut, joissa riski endoteelin vaurioitumiselle	Joko tukilääkityksenä tai jälkihoitona endoteelivaurioiden hoitoon	Netarsudiili, ripasudiili (Syed ja Rapuano 2021, Karri ja Chong 2023)
Soluviljely	Endoteelisolujen ja endoteelin esiastesolujen jakautumisen tehostus.	Y-27632, netarsudiili, ripasudiili (Peh ym. 2023, Shin ym. 2023)

3.1 Fuchsin dystrofia

Merkittävimpiin sarveiskalvon endoteelivaurioiden aiheuttajiin kuuluu FECD, sairaus, joka vaurioittaa sekä descemetin kalvoa että endoteelisoluja, jotka ajautuvat lisääntyneen stressin myötä apoptoosiin (Syed ja Rapuano, 2021). Descemetin kalvoon muodostuu nestepisaroihin toiseen kahdesta ylimääräisestä kalvon kerroksesta, joiden muodostuminen johtuu poikkeavasta kollageeni VIII ja muiden soluväliaineen proteiinien tuotosta endoteelisoluista (de Oliveira ja Wilson, 2020). Muutokset johtavat descemetin kalvon paksuuntumiseen (de Oliveira ja Wilson, 2020). Nestepisarot ovat myös haitallisia endoteelisoluille ja häiritsevät solukerroksen muodostumista (Price ym. 2021). Endoteelisolut ja descemetin kalvo ovat siis tiiviissä yhteistyössä ja kärsivät toisiinsa kohdistuneista vaurioista. Ensimmäisiä kokemuksia ROCK- inhibiittorien ihmiskäytöstä on saatu Y-27632:lla FECD- potilaalla, jolla sarveiskalvo inhibiittorin käytön myötä kirkastui (Price ym. 2021).

FECD:tä hoidetaan tyypillisesti DWEK (Descemetorhexis Without Endothelial Keratoplasty) tai DSO (Descemet Stripping Only) toimenpiteellä, jossa potilaan vaurioitunutta endoteelikudosta ja descemetin kalvoa poistetaan kudosten keskeltä välttyen tarpeelta kudossiirteelle, jolla on riski immunologisen reaktion synnyttämiseen. DWEK ja DSO toimenpiteet viittaavat samaan toimenpiteeseen eri nimityksin. (Syed ja Rapuano, 2021) Koska toimenpiteessä poistetaan jo ennestään jakautumiskyvyttömiä endoteelisoluja ja heikosti uusiutuvaa descemetin kalvoa, voi ROCK- inhibiittorin käyttö operaation jälkihoidossa olla tarpeellista. Vaikka palautuminen operatiosta tapahtuu myös ilman ROCK- inhibiittoria on ripasudiili- silmätipoilta jälkihoidossa havaittu nopeampi turvotuksen lievittyminen sarveiskalvossa sekä tehokkaampi endoteelisolumäärän kasvu verraten hoitoon, jossa ei ole käytetty ripasudiilia (Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Turvotuksen lievittyminen nopeutuu, kun ROCK- inhibiittoreilla saadaan tehostettua endoteelisolujen jakautumista ja siten nesteen pumppausta stroomasta (Moura-Coelho ym. 2019).

Netarsudiilin hyödyntämisestä DWEK/DSO tapauksissa on vähemmän kokemusta, mutta lupaavaa näyttöä (Karri ja Chong, 2023). Davies ym. saivat ripasudiilia vastaavia tuloksia netarsudiilihoidolla kaihileikkaukseen yhdistetystä DWEK/DSO toimenpiteestä FECD- potilailla (Davies ym. 2021). Netarsudiilihoidolla saatiin turvotus laskemaan nopeammin johtaen kaikkien netarsudiililla hoidettujen potilaiden sarveiskalvon kirkastumiseen. Tutkimuksessa havaittiin myös hoidon ajoittamiseen liittyviä muutoksia endoteelisolujen morfologiassa ja endoteelisolumäärässä. Netarsudiilihoidon välitön aloitus toimenpiteen jälkeen johti morfologialtaan yhdenmukaisempien solujen muodostumiseen poistoalueelle verrattuna viivästyneeseen hoidon aloitukseen, jolloin solujen morfologia ja koot olivat vaihtelevampia keskenään. Välitön aloitus johti myös merkitsevästi suurempaan lopulliseen solumäärään (Davies ym. 2021).

Toisaalta sarveiskalvon turvotusta lieventävä vaikutus voidaan saavuttaa myös myöhemmin aloitetulla hoidolla ja ROCK- inhibiittoreita voidaankin joissain tapauksissa käyttää ”pelastusterapiana” DWEK/DSO tapauksiin, joissa endoteeli ei ole itsestään toipunut operaatiosta ja sarveiskalvon turvotusta ei ole muutoin saatu laskemaan. Turvotus saadaan näin laskemaan jo 1–2 viikossa, kun pelastusterapiassa on käytetty ripasudiilia tai netarsudiilia, mutta myös Y-27632:lla on saatu vastaavanlaisia tuloksia. (Moura-Coelho ym. 2019, Davies ym. 2021, Syed ja Rapuano, 2021) Voi kuitenkin olla suotuisampaa aloittaa ROCK- inhibiittorihoito heti operaation jälkeen, jotta solujen morfologia ja määrä olisi palaututtua optimaalisempi (Davies ym. 2021). Koska strooman nesteenpoistosta ja turvotuksen lievityksestä vastaavat endoteelisolut, viittaa tehostunut turvotuksen lievitys ROCK- inhibiittorihoidon yhteydessä endoteelisolujen jakautumiseen ja toiminnan tehostumiseen (Price ym. 2021, Sridhar 2018). Tätä tukevat tulokset endoteelisolumäärien kasvusta ROCK- inhibiittorilla DWEK/DSO toimenpiteen jälkihoidossa (Davies ym. 2021, Syed ja Rapuano, 2021). Joissakin tutkimuksissa on havaittu, että netarsudiilin käyttö DSO jälkeen on lisännyt poistoalueen endoteelisolutiheyttä, mutta vähentänyt perifeeraalista tiheyttä (Syed ja Rapuano, 2021). Ripasudiilihoidolla taas perifeeraalinen solutiheys on pysynyt ennallaan sen lisäksi, että poistoalueen solutiheys on kasvanut. Koska solujen vaellus tapahtuu sarveiskalvon periferiasta on solujen liikkuminen näiden tutkimusten perusteella mahdollisesti aktiivisempaa netarsudiilihoidolla ripasudiilihoitoon verrattuna (Syed ja Rapuano, 2021).

3.2 Strooman arpeutumisen esto

Näkökyvyn heikkenemiseen voi turvotuksen lisäksi vaikuttaa arpikudoksen kehittyminen stroomassa, kun descemetin kalvon ja endoteelisolujen luoma este kammionesteen ja strooman välillä poistetaan. Myofibroblastit tuottavat arpeutumisessa stroomaan epäjärjestäytyntä samentavaa soluväliainetta toimien myös itse samentavina komponentteina. (de Oliveira ja Wilson, 2020) Arpeutumisen ehkäisemiseksi on edullista, että endoteelisolut ja descemetin kalvo uusiutuvat mahdollisimman nopeasti, mitä voidaan edesauttaa ROCK- inhibiittorien käytöllä, vaikkakin descemetin kalvon rooli arpeutumisen estossa voi olla merkittävämpi (Davies ym. 2021, Sampaio ym. 2021, Karri ja Chong 2023). ROCK- inhibiittoreilla on lisäksi TGF- β inhiboivaa vaikutusta, mikä suoraan estää TGF- β - välitteistä arpeutumista (Moura-Coelho ym. 2019). TGF- β 2 myös estää endoteelisolujen jakautumista, joten ROCK- inhibiittorilla voidaan myös tätä kautta ajatella olevan jakautumista edistävää vaikutusta (Price ym. 2021). TGF- β :n endoteelisoluihin kohdistuvien vaikutusten vuoksi voi sen läsnäolo tai poissaolo endoteelisolujen in vitro- tutkimuksissa vaikuttaa merkittävästi tuloksiin ja voi siksi olla tarpeellista sisällyttää TGF- β soluviljelmiin, jotta vältytään tulosten vääristymiseltä verratessa in vivo- olosuhteisiin (Peh ym. 2023).

3.3 Descemetin kalvon uusiutuminen

Endoteelisoluilla on todennäköisesti vaikutusta descemetin kalvon uusiutumiseen, sillä ne ovat tärkeä tekijä kalvon muodostuksessa ja maturaatiossa. Vaikka kanikokeissa descemetin kalvo uusiutuu osin strooman soluista, vaatii lopullisen kypsän kalvon muodostuminen endoteelisolujen metaboliaa. Descemetin kalvo uusiutuu myös melko hitaasti ja uusiutuu kypsäksi kalvoksi kaneilla 6 kuukauden kuluessa vauriosta. (Sampaio ym. 2021) Sekä descemetin kalvo että endoteelisolut vaativat toiminnallisuudessaan toistensa läsnäoloa ja siksi kudoksiin kohdistuneen vaurion sattuessa on tärkeää, että molemmat kudokset uusiutuvat alueella (de Oliveira ja Wilson, 2020, Price ym. 2021). Eläin- ja ihmiskudoksissa pienet vauriot korjaantuvat itsestään, mutta suurempien vaurioiden palautuminen voi ihmisillä olla puutteellista ja vaatia ROCK- inhibiittorin käyttöä, kuten Sampaio ym. kokeiden kaltaisissa tapauksissa, joissa endoteelia ja descemetin kalvoa poistetaan jopa 8mm levyiseltä alueelta (Sampaio ym. 2021). Endoteelisolut tarvitsevat descemetin kalvoa kiinnittymiseen ja kalvon tuleekin siksi muodostua alueelle, jotta endoteelisolut voivat liikkua tai jakautua vaurioalueella (de Oliveira ja Wilson, 2020, Price ym. 2021). Descemetin kalvon muodostuminen taas vaatii endoteelisolujen läsnäoloa, jotta sen lopullinen koostumus vastaisi tervettä kalvoa (de Oliveira ja Wilson, 2020, Price ym. 2021, Sampaio ym. 2021).

Koska ROCK- inhibiittoreilla on havaittu vaikutusta endoteelisolujen jakautumiseen ja liikkumiseen, on hyvin mahdollista, että ne sekundaarisesti tehostavat myös descemetin kalvon uusiutumista vaurioalueella (Moura-Coelho ym. 2019, Syed ja Rapuano, 2021, Karri ja Chong, 2023). Tehostuneen descemetin kalvon tuotannon myötä endoteelisolut saavat nopeammin kiinnittymisalustaa vaurioalueella, jossa kalvo on vaurion myötä puutteellinen, ja palautuminen vauriosta voi nopeutua, mikä on suotuisaa sarveiskalvon terveyden kannalta ehkäisten myös arpikudoksen syntymistä. ROCK- inhibiittorien vaikutuksista descemetin kalvoon ei ole juurikaan tehty tutkimuksia ja tulevaisuuden tutkimuksissa voitaisiinkin mahdollisesti keskittyä descemetin kalvon uusiutumista tehokkaimmin edistävän ROCK- inhibiittorin löytämiseen. Descemetin kalvon uudistamiseen tähtäävässä ROCK- inhibiittorihoidoissa olisi kuitenkin tärkeää varmistua esimerkiksi FECD:n vuoksi vaurioituneiden endoteelisolujen poistosta, jotta proliferoituvat endoteelisolut tuottaisivat tervettä kalvoa. Erilaiset hoitokeinot descemetin kalvon uudistamiseen ovat merkittävä tutkimuskohde, sillä erityisesti FECD:ssä descemetin kalvo on vaurioitunut ja siten muuttaa endoteelisolujen toimintaa (Syed ja Rapuano, 2021).

3.4 Endoteelisolujen in vitro- kasvatus

ROCK- inhibiittoreita, erityisesti Y-27632:ta, on myös hyödynnetty kudosteknologioissa primäärisolujen in vitro- kasvatuksessa (Kinoshita ym. 2018, Price ym. 2021, Peh ym. 2023, Shin ym. 2023).

In vitro- kasvatusta kuitenkin rajoittaa in vivo- olosuhteita vastaavasti endoteelisolujen heikko jakautumiskyky, mitä voidaan jonkin verran sivuuttaa ROCK- inhibiittorin käytöllä soluviljelmissä. Tuoreimpia saavutuksia ROCK- inhibiittorien hyödyntämisestä in vivo- kudosteknologioissa on saatu Kinoshita ym. tutkimuksessa, jossa endoteelisoluja onnistuneesti injektioitiin potilaiden sarveiskalvon takaosaan descemetin kalvoa vasten (Kinoshita ym. 2018). Nuorten kuolleiden luovuttajien kudoksesta eristettyjä primäärisiä endoteelisoluja viljeltiin ennen injektioita in vitro ja Y-27632:ta käytettiin sekä viljely- että injektiovaiheissa tukemaan solujen selviytymistä, jakautumista ja kiinnittymistä. Soluja siirrostettiin in vitro 2–3 kertaa ennen injektioita hyödyntäen Y-27632:ta siirrostettaessa kuoppalevylle, mutta jättäen inhibiittori seuraavissa mediuminvaihdossa pois (Kinoshita ym. 2018). Kiinnittyminen descemetin kalvoon tehostuu ROCK- inhibiittorin aktiinin ja myosiinin supistusta inhihoivan vaikutuksen vuoksi (Moura-Coelho ym. 2019). Endoteelisolujen in vitro- kasvatusta mahdollistaa luovuttajan kudoksen käytön laajemmin, mahdollisesti useammalla potilaalla, kun alkuperäistä solumäärää saadaan lisättyä.

Peh ym. vertailivat netarsudiilin, AR-13503:n ja Y-27632:n vaikutuksia ihmisen primääristen sarveiskalvon endoteelisolujen jakautumiseen 24 tunnin ROCK- inhibiittorialtistuksella ja 24 tunnin palautumisajalla (Peh ym. 2023). Verrattuna viljelmiin ilman ROCK- inhibiittoria, inhibiittoria sisältäneissä viljelmissä oli aktiivisempaa jakautumista. Y-27632:ta vastaavat vaikutukset jakautumiseen vaativat kuitenkin netarsudiililta ja AR-13503:lta huomattavasti pienemmät pitoisuudet (Peh ym. 2023). Vaikka ROCK- inhibiittori on tärkeä solujen selviytymiseen käsittelystä, ei sen pitoisuuden lisääminen loputtomasti paranna solujen toimintaa, vaan oli esimerkiksi Shin ym. tutkimuksessa endoteelin esiastesoluilla optimaalisin pitoisuudella 10 μ M inhibiittorilla Y-27632, viitaten, että ROCK- signalointia jossain määrin myös tarvitaan solun toiminnoissa (Shin ym. 2023). Myös netarsudiilin on havaittu olevan myrkyllistä endoteelisoluille pitoisuudella 10 μ M tai enemmän (Peh ym. 2023). ROCK- signalointi vaikuttaa apoptoosiaktiivisuuteen vaihtelevilla tavoilla eri kohdekudoksissa ja sen inhibitio voi johtaa jopa solukuolemaan, mikä voi mahdollisesti johtua ROCK- signaloinnin eriaisteisesta aktiivisuudesta eri kudoksissa (Julian ja Olson, 2014). Netarsudiilin jakautumista edistävälle vaikutukselle optimaaliseksi pitoisuudeksi soluviljelmässä Peh ym. määrittivät 100 nM – 1 μ M ja AR-13503:lle 100 nM – 10 μ M (Peh ym. 2023). Ripasudiilin optimaalinen pitoisuus oli 30 μ M (Peh ym. 2023).

Soluviljelmiin pohjaavia hoitoja voidaan myös mahdollisesti tehostaa hyödyntämällä endoteelin esiastesoluja, joiden läsnäolo sarveiskalvon endoteelikudoksessa on ollut spekulatiivista kohteena (Kopecný ym. 2023). Näiden esiastesolujen on ajateltu löytyvän sarveiskalvon periferiasta, niillä on kantasolutyypillisiä piirteitä eli ovat vähemmän erilaistuneita ja jakautuvat kypsiä endoteelisoluja tehokkaammin (Kopecný ym. 2023, Shin ym. 2023). Shin ym. tutkimuksessa Y-27632 vaadittiin solujen selviytymiseen keräyksestä ja soluviljelmässä (Shin ym. 2023). Jotta esiastesoluja voidaan

käyttää endoteelivaurioiden hoidossa, on merkittävää, että esiastesolut saadaan erilaistettua endoteelisoluiksi, mutta erilaistuminen on optimaalisinta suorittaa alle kolme kertaa siirrostetuista esiastesoluista (Shin ym. 2023). Esiastesoluista erilaistetut endoteelisolut saadaan kuitenkin jaettua jopa 7 siirrostukseen asti, kun taas Kinoshita ym. olivat siirrostaneet jo erilaistuneita soluja vain 2–3 kertaa (Kinoshita ym. 2018, Shin ym. 2023). Endoteelin esiastesolut ovat kauempana solujen vanhenemistilasta, senesenssistä, ja voivat osin siksi jakautua kypsempinä endoteelisolujakin useammin (Kopecny ym. 2023). On jonkin verran näyttöä, että nuorten luovuttajien endoteelisolut ja endoteelin esiastesolut voivat jakautua vanhempia luovuttajia paremmin (Sampaio ym. 2021, Kopecny ym. 2023). Iällä on myös vaikutusta solujen liikkumiskykyyn, eivätkä vanhemmat solut ROCK- inhibiittorin käytöstä huolimatta kykene vaeltamaan yhtä tehokkaasti kuin nuoret (Peh ym. 2023). Tutkimuksissa ROCK- inhibiittorien vaikutuksista kantasoluihin on käytetty lähinnä Y-27632:ta ja muiden ROCK- inhibiittorien vaikutukset vaativatkin tulevaisuudessa jatkotutkimuksia (Kopecny ym. 2023).

4. YHTEENVETO

Sarveiskalvon endoteelisolulla on kriittinen rooli näkökyvyn säilymisessä ja sarveiskalvon kirkkauden ylläpitämisessä (Price ym. 2021). Niiden heikon jakautumiskyvyn vuoksi on pyritty kehittämään keinoja, joilla jakautumista voitaisiin aktivoita, ja lupaavaa näyttöä ongelman ratkaisuun on saatu ROCK- inhibiittoreilla (Syed ja Rapuano, 2021). On selvää, että ROCK- inhibiittorit tehostavat endoteelisolujen jakautumista ja liikettä, joten suurempaa painoarvoa tulevaisuudessa saavatkin inhibiittorien erot toisiinsa nähden ja niiden ominaiset hyöty-haittasuhteet (Syed ja Rapuano, 2021). Netarsudiilin ja sen aktiivisen metaboliitin affiniteetit ROCK- homologieihin ovat ripasudiilia ja Y-27632:ta vahvemmat, mutta netarsudiilin vaikutukset sarveiskalvon epiteeliin voivat olla voimakkaammat kuin muiden inhibiittorien (Ishizaki ym. 2000, Lin ym. 2018, Karri ja Chong, 2023, Peh ym. 2023). Tämä voi aiheuttaa epiteeliin liittyviä haittavaikutuksia, joskin lääkinnällisestä näkökulmasta voi parantaa netarsudiilin imeytymistä epiteelin muodostaman läpäisyesteen häiriintyessä (Ahmed ym. 2023). Netarsudiilin optimaalinen pitoisuus soluviljelmissä on ripasudiilia ja Y-27632:ta alhaisempi, mahdollisesti paremman affiniteettinsa vuoksi, joten sitä tarvitaan pienempiä pitoisuuksia, mikä vähentää myös haittavaikutuksia (Peh ym. 2023). Ripasudiilin affiniteetti taas on Y-27632:ta vahvempi, mutta optimaalipitoisuus soluviljelmissä korkeampi, mikä voi kertoa sen epäspesifisyydestä ja sitoutumisesta myös muihin kohteisiin kuin ROCK- homologieihin (Peh ym. 2023). ROCK- inhibiittorin käyttö endoteelivaurion sattuessa parantaa solujen lopullista morfolo-

giaa, mutta signalointia ei voida täysin inhiboida, sillä se on tietyissä määrin myös soluille elintärkeää (Julian ja Olson, 2014, Moura-Coelho ym. 2019, Davies ym. 2021). Kuitenkin tutkimuksia ROCK- inhibiittorien käytöstä ihmispotilailla endoteelivauriotapauksissa tarvitaan lisää, sillä tutkimusjoukot ovat toistaiseksi olleet varsin pieniä (Karri ja Chong, 2023).

Descemetin kalvon uusiutumisen yhteys ROCK- inhibiittorien käyttöön on vielä verrattain vähän tutkittu aihe. Tiedetään, että endoteelilla on vaikutusta descemetin kalvon uusiutumiseen, joten teoriatasolla endoteelisolujen määrän kasvu ROCK- inhibiittorien vaikutuksesta tehostaisi myös descemetin kalvon tuotantoa (Sridhar 2018, Sampaio ym. 2021). Koska ROCK- inhibiittorit myös tehostavat solujen vaeltamista, tehostaisivat ne descemetin kalvon muodostumista myös endoteelin ja descemetin vaurion alueella, jonne endoteelisolut ovat vaeltaneet (Syed ja Rapuano, 2021, Kopecny ym. 2023). Endoteelisolut tarvitsevat descemetin kalvoa kiinnittyäkseen, joten tehokkaampi endoteelisolujen vaellus vaurioalueelle ROCK- inhibiittorialtistuksen seurauksena tukee myös teoriaa tehokkaammasta descemetin kalvon muodostuksesta vaurioalueella (de Oliveira ja Wilson, 2020, Price ym. 2021). Tutkimustiedosta ROCK- inhibiittorien välisistä eroista descemetin kalvon muodostuksessa olisi hyötyä erityisesti FECD- potilaille, sillä sairautta hoidetaan usein descemetin kalvoa ja endoteelia poistavilla toimenpiteillä (Syed ja Rapuano, 2021). Tehokkaimmin descemetin kalvon muodostusta aktivoiva inhibiittori siis nopeuttaisi kalvon muodostusta vaurioalueella ja siten endoteelisolujen vaeltamista alueelle ja potilaan palautumista operaatiosta. ROCK- inhibiittorin vaikutukset endoteelisoluihin yksinään eivät siis välttämättä määritä niiden lopullista paremmuutta vaan yhteisvaikutukset endoteeliin ja descemetin kalvoon. Descemetin kalvon ominaisuuksien sekä ROCK- inhibiittorivaikutusten määrittäminen vaativat kuitenkin vielä ihmis soluilla tehtäviä tutkimuksia, joissa voidaan hyödyntää eläinkokeista kertynyttä tietoa descemetin kalvon ominaisuuksista.

Tulevaisuuden tutkimuksissa merkittävä lähtökohta on solujen kasvatus ensin in vitro- viljelmissä ja tämän jälkeen injektointi potilaan silmään. Topikaalisessa käytössä, kun tähdätään endoteelisolujen hoitoon, lääkkeen tulee kulkea monen kerroksen läpi ja sen hyötyosuus jää alhaiseksi (Ahmed ym. 2023). In vitro- viljelmissä inhibiittorialtistus saadaan suoraan soluille ja suurempi osuus lääkkeestä hyödynnettyä. Ihmiseen injektoituja endoteelisoluja on kuitenkin kasvatettu vasta Y-27632:ta hyödyntäen ja tekniikkaa voisi laajentaa myös hyödyntämään muita ROCK- inhibiittoreita (Kinoshita ym. 2018). In vitro- kasvatuksessa tulee ottaa huomioon, että viljely ei vastaa täysin silmän fysiologista ympäristöä, joten netarsudiilin metabolia voi olla erilainen verrattuna sarveiskalvossa tapahtuvaan metaboliaan. Voi siis olla suotuisaa suoraan hyödyntää tämän aktiivista metaboliittia viljelmissä. Allogeenisten siirteiden käyttöön liittyy aina immunologisen reaktion riski, joten tätä ongelmaa voitaisiin mahdollisesti lähestyä potilaan omien endoteelin esiastesolujen hyödyntämisellä (Price ym. 2021, Kopecny ym. 2023 Shin ym. 2023). Esiastesolujen etuna on myös solujen jakautuminen jo erilaistuneita soluja useammin (Shin ym. 2023).

5. LÄHDELUETTELO

- Ahmed S, Amin MM, Sayed S. Ocular Drug Delivery: a Comprehensive Review. *AAPS PharmSciTech* 2023;24:66.
- Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67:545–54.
- Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 2012;95:2–7.
- Davies E, Jurkunas U, Pineda R. 2021. Pilot Study of Corneal Clearance With the Use of a Rho-Kinase Inhibitor After Descemetorhexis Without Endothelial Keratoplasty for Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Cornea* 2021;40:899–902.
- de Oliveira RC, Wilson SE. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res* 2020;197:108090.
- Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, ym. Ocular drug delivery. *AAPS J* 2010;12:348–60.
- Guan G, Cannon RD, Coates DE, ym. Effect of the Rho-Kinase/ROCK Signaling Pathway on Cytoskeleton Components. *Genes (Basel)* 2023;14:272.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, ym. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 2000;57:976–83.
- Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, ym. Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res* 2014;39:813–22.
- Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* 2014;5:e29846.
- Karri R, Chong EW. ROCK inhibitors in ophthalmology: A critical review of the existing clinical evidence. *Clin Exp Ophthalmol* 2023;51:472–83.
- Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, ym. Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N Engl J Med* 2018;378:995–1003.
- Kopecny LR, Lee BWH, Coroneo MT. A systematic review on the effects of ROCK inhibitors on proliferation ja/or differentiation in human somatic stem cells: A hypothesis that ROCK inhibitors support corneal endothelial healing via acting on the limbal stem cell niche. *Ocul Surf* 2023;27:16–29.
- Lin C-W, Sherman B, Moore LA, ym. Discovery and Preclinical Development of Netarsudil, a Novel Ocular Hypotensive Agent for the Treatment of Glaucoma. *J. Ocul Pharmacol Ther* 2018;34:40–51.

- Moura-Coelho N, Tavares Ferreira J, Bruxelles CP, ym. Rho kinase inhibitors-a review on the physiology and clinical use in Ophthalmology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2019;257:1101–17.
- Navaratnam J, Utheim TP, Rajasekhar VK, ym. Substrates for Expansion of Corneal Endothelial Cells towards Bioengineering of Human Corneal Endothelium. *J Funct Biomater* 2015;6:917–45.
- Okumura N, Koizumi N, Ueno M, ym. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol* 2012;181:268–77.
- Ong HS, Ang M, Mehta JS. Evolution of therapies for the corneal endothelium: past, present and future approaches. *Br J Ophthalmol* 2021;105:454–67.
- Peh GSL, Bjaeira F, Neo D, ym. Effects of Rho-Associated Kinase (Rock) Inhibitors (Alternative to Y-27632) on Primary Human Corneal Endothelial Cells. *Cells* 2023;12:1307.
- Price MO, Mehta JS, Jurkunas UV, ym. Corneal endothelial dysfunction: Evolving understanding and treatment options. *Prog Retin Eye Res* 2021;82:100904.
- Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2024 update. *Pharmacol Res* 2024;107059.
- Roy O, Leclerc VB, Bourget J-M, ym. Understanding the process of corneal endothelial morphological change in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:1228–37.
- Sampaio LP, Shiju TM, Hilgert GSL, ym. Descemet's membrane injury and regeneration, and posterior corneal fibrosis, in rabbits. *Exp Eye Res* 2021;213:108803.
- Shin H, Min JK, Kim NR, ym. 2023. Effects of Y-27632, a Rho-associated Kinase Inhibitor, on Human Corneal Endothelial Cells Cultured by Isolating Human Corneal Endothelial Progenitor Cells. *Korean J Ophthalmol* 2023;37:31–41.
- Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 2018;66:190–4.
- Syed ZA, Rapuano CJ. Rho kinase (ROCK) inhibitors in the management of corneal endothelial disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2021;32:268–74.
- Wilson SE. Coordinated Modulation of Corneal Scarring by the Epithelial Basement Membrane and Descemet's Basement Membrane. *J Refract Surg* 2019;35:506–16.