

VOT KRÁLIKOV PO INSTILÁCIÍ ZMESI L-ARGININU.HCL SO ZVOLENÝMI ANTIGLAUKOMATIKMI PRIPRAVENEJ IN VITRO

(Porovnávacía štúdia výsledkov experimentálnych prác)

SÚHRN

Ciel': Porovnať výsledky niekoľkých štúdií účinnosti interakciu *in vitro* pripravenej zmesi aminokyseliny L-arginínu.HCl so zvolenými antiglaukómovými liekmi pri ovplyvnení fyziologického vnútroočného tlaku (VOT) králikov v experimente.

Metódy: Experimentálne práce sa realizovali na samiciach 5 králikoch plemena New Zealand White. Do ľavého spojovkového vaku boli o 8,00 hod instilované 2 kvapky 10% roztoku L-arginin.HCl vo zvolenom antiglaukomatiku samotnom (0,5% Timoptol, 0,005% Xalatan, resp. 2% Trusopt) alebo v dvojkombinácii antiglaukomatík (0,5% Timoptol + 0,005% Xalatan, 2% Trusopt + 0,005% Xalatan, resp. fixná kombinácia 0,5% Timolol + 2% Dorzolamid (COSOPT)). VOT bol meraný pred experimentom a v odstupe 15, 30, 60, 120, 180, 240 min a 24 hod po kvapnutí. Pravé oko bolo kontrolné.

Výsledky: Samotná aminokyselina L-arginin.HCl v 10% koncentrácii u králikov znížila VOT v porovnaní s kontrolou v priemere o -2,9 torr. Antiglaukomatiká samotné v priemere oproti kontrole znížili fyziologický VOT: 0,5% Timoptol len o -0,69 torr; 0,005% Xalatan o -2,1 torr; 2% Trusopt o -2,45 torr. Zmes 10% L-argininu.HCl v monokombinácii s antiglaukomatikmi znížila v priemere fyziologický VOT oproti kontrole: s 0,5% Timoptolom o -3,32 torr, s 2% Trusoptom o -4,45 torr, s 0,005% Xalatanom len o -2,1 torr. 10% L-arginin.HCl s dvojkombináciou antiglaukomatík znížila fyziologický VOT: s 0,5% Timoptolom + 0,005% Xalatanom o -2,95 torr; 2% Trusoptom + 0,005% Xalatanom o -4,2 torr a s fixnou dvojkombináciou 0,5% Timolol + 2% Dorzolamid (COSOPT) len o -1,8% .

Závery: Interakciu špecifickej aminokyseliny s príslušným antiglaukomatikom vzniká nová bioaktívna substancia, ktorá má väčší účinok na zníženie fyziologickej hladiny VOT u králikov, ako samostane aplikované antiglaukomatiká. Je to podmienené lepším prestupom ku receptorom vo vráskovci. V experimentoch v zmesi aminokyseliny L-arginínu.HCl s antiglaukomatikmi sa do spojovkového vaku oka aplikuje za *in vitro* podmienok pripravený (už hotový) metabolit (označený ako „bio antiglaukomatikum“). Pritom aminokyselina L-arginin.HCl kombinovaná s antiglaukomatikmi Timoptolom alebo Trusoptom v monoaplikácii, resp. s dvojkombináciou Timoptol a Xalatan alebo Trusopt a Xalatan má na VOT králikov v porovnaní s kontrolou až dvojnásobne vyšší účinok.

Kľúčové slová: interakcia aminokyseliny s antiglaukomatikmi *in vitro*. Efekt zmesi voľnej aminokyseliny s antiglaukomatikmi na VOT králikov

SUMMARY

The Rabbit's IOP Values after Instillation of the L-arginine.HCl with Selected Antiglaucomatic Drugs Mixtures Prepared in Vitro. (Comparative Study of Results of the Experimental Works)

Purpose: In this work the effect by interaction *in vitro* free amino acid L-arginine.HCl and selected antiglaucomatic drugs prepared mixtures on the physiological IOP values in rabbits is compare.

Methods: The experimental works were performed on 5 female rabbits of the New Zealand White species. After instillation 2 drops of *in vitro* prepared 10% solution of the amino acid L-arginine.HCl with antiglaucoma drugs (0.5% Timoptol, 0.005% Xalatan or 2% Trusopt) alone or in double combination mixtures at 8,00 am. into the left conjunctival sac the IOP was measured before and in 15th, 30th, 60th, 120th, 180th, 240th min. and 24 hours after instillation. The right eye was used as control.

Results: The amino acid 10% L-arginine.HCl solution separately decrease the physiologic IOP in rabbit's in confrontation with control eyes -2.9 torr. After antiglaucomatics separately the decrease of the IOP were constated -0.69 torr by 0.5% Timoptol, -2.1 torr by 0.005% Xalatan, resp. -2.45 torr by 2% Trusopt. 10% L-arginine.HCl with combination of mono

PŮVODNÍ PRÁCE

Oláh Z., Veselovský J.

Klinika oftalmológie LF UK v Bratislave,
prednosta doc. MUDr. Vladimír Krásnik, Ph.D.

✉ Do redakce doručeno dne 1. 2. 2012

📄 Do tisku přijato dne 7. 5. 2012

Prof. MUDr. Zoltán Oláh, DrSc.,
emeritný profesor
Klinika oftalmológie LF UK v Bratislave
Ružinovská 6
826 06 Bratislava, SR
E-mail: olah@ru.unb.sk

antiglaucomatics mixture decrease the physiologic IOP by 0.5% Timoptol -3.32 torr, by 2% Trusopt -4.45 torr, by 0,005% Xalatan only 2.91 torr. Application of 10% L-arginine-HCl in double combination of antiglaumatics decrease the physiologic IOP by 0.5% Timoptol & 0.005% Xalatan -2.96 torr, by 2% Trusopt & 0.005% Xalatan -4.32 torr and COSOPT (fixed combination of 0.5% Timolol maleat & 2% Dorsolamid.HCl) only -1.8 torr.

Conclusions: We assume that the mentioned mixtures were able to decrease the physiologic IOP in rabbits through their better penetration to the receptors of the ciliary body. The mixture of the L-arginine.HCl with antiglaucomaticum Timoptol or Trusopt, resp. double combination of Timoptol & Xalatan or Trusopt & Xalatan was twice as effective as any of the mentioned antiglaucomatic drugs used separately. We conclude that the increased effectivity of the mixtures compared with the separate components is related to the instillation of the by now ready „bioantiglaucomatic“.

Key words: Interaction *in vitro* of amino acid and antiglaucomatics. Effect of the amino acids and antiglaucomatic drug mixtures on the rabbit's IOP

Čes. a slov. Oftal., 68, 2012, No. 2, p. 77-81

ÚVOD

V doterajších našich prácach (Veselovský a kol., 1998a, 1998b, 2002; Oláh a kol., 2003) sme zistili, že mechanizmus pôsobenia antiglaukomatik všeobecne spočíva v ich interakcii s voľnými aminokyselinami už v spojovkovom vaku za vzniku novej bioaktívnej substancie (metabolitu). Tento nový metabolit znižuje fyziologický vnútroočný tlaku (VOT) u králikov. Zistili sme, že interakcia voľných aminokyselín s antiglaukomatikmi v spojovkovom vaku má špecifický charakter (Veselovský a kol., 2003a, 2003b, 2004a; 2004b).

V tejto práci sme si položili za cieľ na základe uskutočnených sérií experimentov vzájomne porovnať a potvrdiť špecifickosť pôsobenia voľnej esenciálnej aminokyseliny L-arginínu.HCl v spojovkovom vaku so zvolenými 3 antiglaukomatikmi (Timoptol, Xalatan alebo Trusopt), resp. ich dvojkombinácie po interakcii *in vitro* na fyziologický VOT králikov (Veselovský a kol., 2002, 2003b, 2004b; Oláh a kol., 2003, 2004, 2005). Nám doteraz prístupné literárne prameňe sa nezmieňujú o fyziologickom význame a funkciách interakcie tejto aminokyseliny v kombinácii antiglaukomatikmi

MATERIÁL A METÓDA

Experimenty boli realizované vždy v sérii piatich dospelých samiciach králikov – plemena Novozelandský biely, zo štandardného chovu Výsk. ústavu živočíšnej výroby v Nitre (reg. č.: Sk – Ch – 29004, Nitra, Slovakia). Králiky sme po 10-dňovej adaptácii chovali v podmienkach s konštantnou teplotou 20 °C, normálnym svetelným režimom, boli kŕmené štandardnou zmesou a voda im bola podávaná ad libitum.

Pri hodnotení experimentov sme z esenciálnych aminokyselín vybrali pre živočíchov a človeka netoxický dikarboonovú aminokyselinu **L-arginin.HCl** (od fy. Merck) v 10% roztoku a továrensky pripravené **antiglaukomatiká: a/** neselektívny β -blokátor 0,5% Timolol maleas (**0,5% Timoptol** fy. Zentiva), **b/** esterický analóg prostaglandínov $F_{2\alpha}$ 0,005% Latanoprost (**0,005% Xalatan** fy. Pharmacia & Upjohn), **c/** inhibitor karboanhydrázy 2% Dorsolamid.HCl (**2% Trusopt** fy. Merck & Co.) alebo **d/** fixná kombinácia 2% Dorsolamid.HCl (= 2% Trusopt) a 0,5% Timolol maleas (= 0,5% Timoptol) – **COSOPT** fy. MSD.

1. Najprv sme hodnotili vplyv samotnej aplikovanej aminokyseliny 10% L-arginin.HCl ako aj samotných antiglaukomatik (0,5% Timoptol, 0,005% Xalatan, resp. 2% Trusopt) na VOT králikov.

2. Potom sme pristúpili k porovnaniu pôsobenia aminokyseliny 10% L-arginínu.HCl v kombinácii s jedným antiglaukomatikom: 0,5% Timoptolom; 0,005% Xalatanom alebo 2% Trusoptom;

3. V tretej časti bolo porovnávané pôsobenie aminokyseliny 10% L-arginínu.HCl v dvojkombinácii antiglauko-

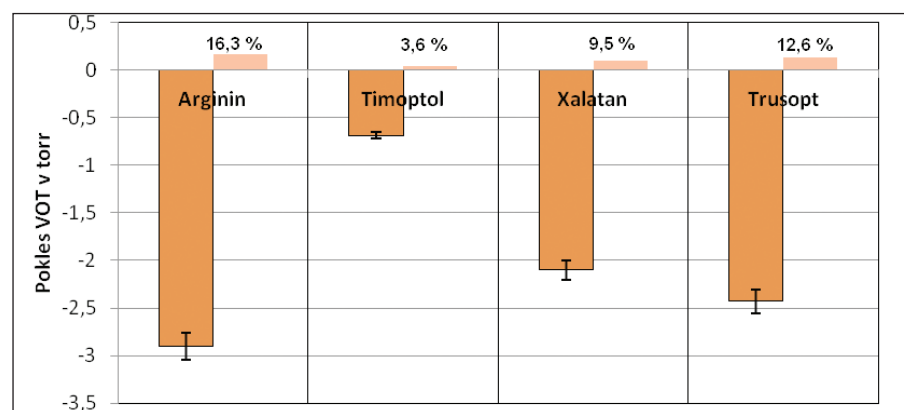
matík: 0,5% Timoptol a 0,005% Xalatan; 2% Trusopt a 0,005% Xalatan alebo fixná kombinácia 0,5% Timolol maleas (= 0,5% Timoptol) & 2% Dorsolamid.HCl (= 2% Trusopt) – COSOPT fy. MSD.

Uvedené roztoky boli aplikované do spojovkového vaku ľavého oka králikov jednorazovo po dvoch kvapkách, vždy o 8,00 h. Takto sme chceli obsadiť všetky receptory tkanivových štruktúr, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe a odtoku komorového moku. Pre instiláciu v rámci experimentov sme použili **a/** roztok esenciálnej aminokyseliny L-arginin.HCl rozpustenej v aqua pro injectione a **b/** L-arginin.HCl zmiešaný vo zvolenom antiglaukomatiku (resp. v dvojkombinácii antiglaukomatik), tak aby koncentrácia aminokyseliny bola 10% a koncentrácia antiglaukomatika (antiglaukomatik) a pH ostali nezmenené. Z hľadiska možných reziduí sme medzi kvapkaním ďalšieho roztoku dodržali vždy odstup jedného týždňa. Pravé oko toho istého jedinca, ktoré nebolo ovplyvnené žiadnym roztokom slúžilo ako kontrolné.

Hodnoty VOT sme porovnali pred instiláciou a v čase 15, 30, 60, 120, 180 a 240 min., resp. 24 hod. od instilácie. VOT sme merali tonometrom Schiötz a kontrolovali aj aplanančným tonometrom Maklakova, resp. aplanančným tonometrom "TONO-PEN XL" fy. Medtronic SOLAN, USA. Hodnoty pri uvedených spôsoboch merania VOT neboli odlišné. Zistené hodnoty VOT sme vyhodnotili Studentovým t-testom.

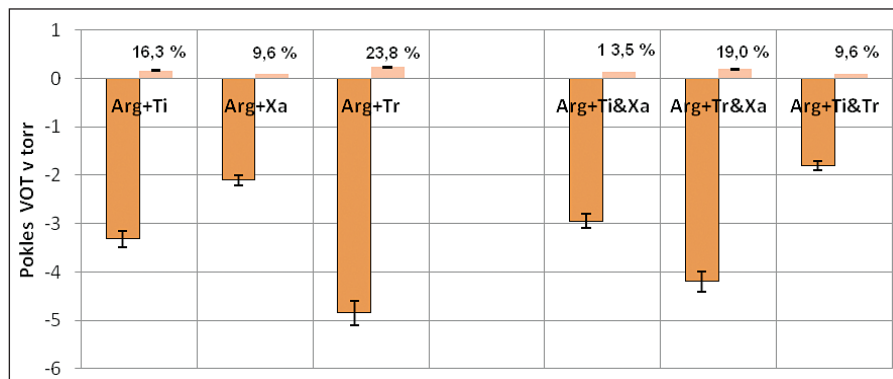
VÝSLEDKY

Porovnanie výsledkov sa realizovalo na podklade zistení priemerného ovplyvnenia fyziologického VOT králikov v dielčích experimentoch. Najprv uvádzame ovplyvnenie VOT králikov po



Graf 1. Pokles VOT králikov po instilácii 10% L-arginínu.HCl a po antiglaukomatikách aplikovaných samotne.

Legenda: V prvom riadku (nad 0) je uvedený pokles VOT v % v porovnaní s kontrolou po aplikovaní jednotlivých zložiek. Stĺpce grafu dokumentujú absolútne hodnoty doplnené rozptylom zistených hodnôt VOT.



Graf 2. Pokles VOT králikov po instilácii 10% L-argininu.HCl s vybranými antiglaukomatikmi v mono- a dvojkombinácii.

Legenda: Arg+Ti = 10% L-arginin.HCl s 0,5% Timoptolom; Arg+Xa = 10% L-arginin.HCl s 0,005% Xalatanom; Arg+Tr = 10% L-arginin.HCl s 2% Trusoptom; Arg+Ti&Xa = 10% L-arginin.HCl s 0,5% Timoptolom a 0,005% Xalatanom; Arg+Tr&Xa = 10% L-arginin.HCl s 2% Trusoptom a 0,005% Xalatanom; Arg+Ti&Tr = 10% L-arginin.HCl s COSOPT-om (fixná kombinácia 0,5% Timololu a 2% Dorzolamidu (Trusopt)). V prvom riadku (nad 0) je uvedený pokles VOT po danej kombinácii v % v porovnaní s kontrolou. Stĺpce grafu znázorňujú absolútne hodnoty a rozptyl zistených hodnôt VOT.

aplikovaní aminokyseliny 10% L-argininu.HCl a samotných antiglaukomatik (Timoptol, Xalatan alebo Trusopt). V druhom a treťom bode sú uvedené výsledky porovnania kombinácie 10% L-argininu.HCl so zvolenými antiglaukomatikmi v mono, resp. v dvojkombinácii.

1. Pokles VOT po aplikovaní 10% L-argininu.HCl a zvolených antiglaukomatik aplikovaných samotne (graf 1).

Po topickej aplikácii samotnej aminokyseliny 10% roztoku L-argininu.HCl došlo k významnému poklesu VOT u králikov s priemerným poklesom -2,9 torr. Po aplikácii antiglaukomatik samotne sme zistili: po 0,5% Timoptole pokles nesignifikantný (len -0,69 torr), po 0,005% Xalatane aj 2% Trusopte pokles významný (-2,1 resp. -2,43), takmer totožný s poklesom po samotnej aplikovanom arginine.

2. Porovnanie výsledkov aplikácie 10% L-argininu.HCl s jedným antiglaukomatikom (Graf 2):

a/ Aplikácia 10% L-argininu.HCl v 0,5% Timoptole v priebehu celého pozorovania významne znížila hladinu VOT s priemerným poklesom oproti kontrole -3,32 torr (o 16,3%).

b/ Instilácia zmesi 10% L-argininu.HCl v 0,005% Xalatane znížila VOT v porovnaní s kontrolným okom v priebehu 24 hod. o -2,1 torr (pokles o 9,69 % oproti kontrole).

c/ Kvapnutie zmesi 10% L-argininu v 2% Trusopte vo všetkých časových úsekoch významne znížila fyziologickú hladinu VOT. Priemerný pokles VOT bol -4,9 torr, čo predstavuje pokles o 23,8 % v porovnaní s kontrolou.

3. Porovnanie výsledkov aplikácie 10% L-argininu.HCl s dvojkombináciou antiglaukomatik (pozri graf 2):

a/ Pokles VOT po aplikácii zmesi 10% L-argininu.HCl v dvojkombinácii antiglaukomatik 0,5% Timoptol + 0,005%

Xalatan mal bifázický charakter. Priemerný pokles počas 24 hodín bol -2,9 torr (čo činí 13,5 % oproti kontrole).

b/ Instilácia zmesi 10% L-argininu.HCl v dvojkombinácii antiglaukomatik 2% Trusopt + 0,005% Xalatan v každom časovom úseku významne znížila hladinu VOT a počas 24 hodín mal bifázický priebeh. Priemerné zníženie hladiny VOT za 24 hodín oproti kontrolnému oku bolo o -4,2 torr (o 19 % v porovnaní s kontrolou).

c/ Zmes 10% L-argininu.HCl vo fixnej dvojkombinácii 0,5% Timolol maleas (Timoptol) s 2% Dorzolamidom.HCl (Trusopt) COSOPT-e: vo všetkých časových intervaloch znížila VOT. Počas celého sledovania VOT poklesol v priemere oproti kontrolnému oku len o -1,8 torr, čo predstavuje 9,64 % oproti kontrole.

SÚHRN

Pri porovnaní našich uvedených experimentálnych výsledkov jednoznačne dokazujeme skutočnosť, že aminokyselina L-arginin.HCl má v zmesi predovšetkým s antiglaukomatikom Timoptolom výrazne vyššiu aktivitu pri znížení fyziologického VOT králikov (vyššie 4-násobnú) a takmer dvojnásobnú s Trusoptom oproti kontrole. Súčasne sa ukázala analogicky výrazne vyššia efektívnosť aj pri dvojkombinácii antiglaukomatik Timolole s Xalatanom, resp. Trusoptu s Xalatanom. Avšak pri kombinácii aminokyseliny fixnou dvojkombináciou COSOPT (Timolol + Dorzolamid) bo zistený pokles VOT nižší ako pri aplikovaní oboch antiglaukomatik samotne, resp. aj v kombinácii so samotnou aminokyselinou. Porovnanie

ovplyvnenia VOT zvolenými antiglaukomatikmi aplikovanými samostatne s ich dvojkombináciou ukazuje na fakt, že zvolená aminokyselina L-arginin.HCl pôsobí na VOT králikov špecifickejšie v kombinácii danej aminokyseliny s jedným antiglaukomatikom, ako to znázorňuje porovnanie výsledkov na grafe 2.

DISKUSIA

Porovnanie našich experimentálnych výsledkov potvrdzujú nami opakovane zaznamenaný mechanizmus účinku antiglaukomatik pri znížení hladín VOT u králikov (Veselovský a spol., 1998a; 1998b). K tomu, aby antiglaukomatik účinne (signifikantne) znižovali VOT musia sa interakciu s voľnými aminokyselinami zbioaktivizovať (Bito a kol., 1983; Chuman a kol., 2000). Topicky aplikované antiglaukomatikum pôsobí ako „prodroga“, ktorá až po zinteragovaní s voľnými aminokyselinami v slzách môže prekonať bariéry v tkanivových štruktúrach oka. V spojovkovom vaku prítomná Kahán (1982) preukázala prítomnosť 11 voľných aminokyselín ktoré môžu špecificky interagovať s antiglaukomatikmi aplikovanými do spojovkového vaku *in vivo*. Prítomnosť zdôrazňuje aj skutočnosť lokálnej syntézy arginínu v rohovke, čo hrá zrejme významnú úlohu ako podklad pre interakciu antiglaukomatikmi.

V našich pozorovaniach sme zistili, že pre žiaduci výsledok musí interagovať vhodná voľná aminokyselina s príslušným antiglaukomatikom a táto interakcia je vysoko špecifická (Veselovský a kol., 2004a; Oláh a kol., 2005). V zmesi aminokyseliny 10% L-argininu.HCl s antiglaukomatikmi: Timoptol (0,5% Timolol maleas), Xalatan (0,005% Latanoprost), resp. Trusopt (2% Dorzolamid.HCl) samotnými alebo ich dvojkombináciou *in vitro* interakciu vznikne metabolit so zvýšenou účinnosťou na VOT u králikov.

Pri interakcii aminokyseliny a antiglaukomatika vzniknutá nová bioaktívna látka podľa našich nálezov dala farebne pozitívnu reakciu s Ninhydrínovým činidlom – modrofialové zafarbenie – charakteristickú pre peptidické látky. Domnievame sa preto, že v našich experimentoch interakciu voľnej aminokyseliny L-argininu.HCl s antiglaukomatikmi (Timoptolom, Xalatanom, resp. Trusoptom) v mono alebo dvojkombináciou vznikol *in vitro* nový metabolit, ktorý predstavuje vlastne hotový produkt, pôsobiaci zníženie produkcie komorového moku vráskovcom. Predpokladáme preto, že ak sa vo fyziologických podmienkach pre nedostatočnú hladinu aminokyselín v spojovkovom vaku po aplikácii antiglau-

komatík nevytvorí nová bioaktívna látka, alebo sa tvorí len v nedostatočnom množstve, nedochádza k signifikantnému zintenzívneniu vplyvu antiglaukomatika na fyziologické hodnoty VOT. Naše experimenty dokázali, že interakciou *in vitro* pripravený metabolit poskytuje u králikov vo fyziologických podmienkach výraznejšie ovplyvnenie (zníženie) VOT už počas prvých 4 hodín po aplikácii (Veselovský a kol., 2002; 2003). Táto interakcia sa odohráva tak za *in vivo* ako aj *in vitro* podmienok. Avšak väčší efekt sa dostaví, keď sa do spojovkového vaku oka aplikuje za *in vitro* podmienok pripravený (už hotový) metabolit, ktorý sme označili ako „bioantiglaukomatikum“ (Oláh a kol. 2005b; Veselovský a kol. 2006). Teda *in vitro* vzniká nová látka, ktorá pôsobí ako už hotové antiglaukomatikum. Predpokladáme preto, že ak sa pre nedostatočnú hladinu aminokyselín v spojovkovom vaku nevytvorí nová bioaktívna látka, alebo sa tvorí len v nedostatočnom množstve, nedochádza k signifikantnému zintenzívneniu vplyvu antiglaukomatika na fyziologické hodnoty VOT.

Výsledky experimentov dokazujú, že interakciu špecifickej aminokyseliny s daným antiglaukomatikom získaná nová bioaktívna substancia má väčší účinok na zníženie fyziologickej hladiny VOT u králikov, ako samostatne aplikované antiglaukomatiká (Oláh a kol., 2004). Naše zistenia dokazujú, že aminokyselina L-arginín.HCl pri spoločnej aplikácii s tromi zvolenými antiglaukomatikmi (Timoptolom, Xalatanom alebo Trusoptom), resp. ich dvojkombináciou intenzívnejšie interaguje pravdepodobne len s jedným, aktívnejším antiglaukomatikom. Pri súhrnnom porovnaní sily účinku týchto zmesí aminokyseliny arginínu so zvolenými antiglaukomatikmi s odlišnými účinkami sme zistili, že 10% L-arginín.HCl v 2% Trusopte má signifikantne vyšší účinok na zníženie VOT ako 10% L-arginín.HCl v 0,5% Timoptole (Oláh a Veselovský, 2003) a zvlášť v Xalatlane (Veselovský a kol., 2004b). Je to v súlade s údajmi literatúry (Choudhri a kol., 2000). Obdobne výrazné rozdielne výsledky sme zistili aj pri interakcii arginínu s dvojkombináciou antiglaukomatík, pričom najnižšia efektívnosť sa ukázala pri kombinácii L-arginínu.HCl

s fixnou dvojkombináciou COSOPT. Tento poznatok potvrdzuje nami zdôrazňovaný interakčný vzťah voľných aminokyselín s antiglaukomatikmi a aj vznik nového „bioantiglaukomatika“, ktorý už ako *in vitro* vzniknutý je aplikovaný do spojovkového vaku (Veselovský a kol., 2003).

Výrazný efekt na fyziologický VOT v zmesi aminokyseliny arginínu s Dorzolamidom zrejme spočíva v aplikovaní už hotového metabolitu, ktorého chemická štruktúra ho robí bioaktívnejším v zmysle silnejších inhibičných účinkov na aktivitu karboanhydrázových izoenzymov. Ide najmä o CA II v epiteliálnych bunkách výbežkov vráskovca, kde tento enzým podľa Sugruve a spol. (1997) je zo všetkých tkanivových štruktúr oka prítomný v najväčšom množstve a ktorý podľa Sugruve a spol. (1997, 2000), Kim a spol. (2002) hrá dôležitú úlohu v sekrécii, regulácii, ako aj v tvorbe komorového moku, resp. jeho v cirkulácii v oku (Harris a spol., 2001) a následne aj v regulácii VOT.

Účinok metabolitu vzniknutý interakciou 10% L-arginínu.HCl a COSOPT-u (pripravený *in vitro*) je nízky, predstavuje len 9,6% v porovnaní účinkami L-arginínu.HCl s Dorzolamidom (priemerný pokles VOT o 23%), alebo L-arginínu.HCl s Timololom (priemerný pokles VOT o 12,5%). Z toho vyplýva, že fixnej dvojkombinácii COSOPT-e (Timolol + Dorzolamid) už nepôsobia pôvodné samostatné komponenty, ale nový metabolit (Oláh a kol., 2005a). Ak by totiž boli prítomné v pôvodnej podobe a každé antiglaukomatikum by interagovalo s prítomnou voľnou aminokyselinou samostatne a účinnok COSOPT-u by bol vyšší.

Z tohto nášho výsledku môžeme dedukovať, že pre väčšie a časovo dlhšie zníženie fyziologickej hodnoty VOT u králikov je výhodnejšie aplikovanie aminokyseliny len s jedným (samotným) antiglaukomatikom a nie dvojkombináciou. Túto skutočnosť potvrdzujú naše ďalšie výsledky, a to kombinácia napr. aminokyseliny 10% Taurínu v 0,5% Timolole za 24 hodín v priemere znížila fyziologický VOT králikov o 4,2 torr, signifikantný pokles bol v každom časovom intervale (Oláh a spol., 2007). Obdobne výsledky sa zistili aj po aplikácii aminokyseliny 10%

Glycínu v 0,5% Timoptole (Veselovský a spol. 2006). Pokladáme za potrebné zdôrazniť skutočnosť, že napriek tomu, že účinok L-arginínu.HCl v COSOPT-e na zníženie fyziologickej hodnoty VOT králikov bol z uvedených bioantiglaukomatík najmenej účinný, ale hladina VOT ešte v 24 hodine nedosiahla hodnotu VOT kontrolného oka. Toto svedčí o dlhšom účinku pôsobenia zmesi L-arginínu.HCl s COSOPT-om (viac ako 24 hod).

ZÁVER

Porovnanie výsledkov našich zistení dokazujú, že samotná aminokyselina L-arginín.HCl v 10% koncentrácii po topickej aplikácii do spojovkového vaku normotenzných albinotických králikov znižuje VOT vo všetkých časových úsekoch o 16,3 %. Samotné antiglaukomatikum Timoptol znižuje len nesignifikantne, kým Xalatan a Trusopt znižujú takmer analogicky ako arginín. Potvrdili sme pritom naše predchádzajúce experimentálne zistenia, že voľné aminokyseliny interagujú s antiglaukomatikmi za vzniku nového bioaktívneho metabolitu. Interakciou *in vitro* vzniknutý metabolit L-arginínu.HCl v Timoptole a Trusopte má u normotenzných albinotických králikov výraznejší, takmer dvojnásobný efekt na VOT oproti Xalatanu. Dvojkombinácia L-arginínu.HCl s Timoptolom a Xalatanom, resp. Dorzolamidom a Xalatanom taktiež výrazne znižuje VOT na rozdiel od COSOPT-u (Dorzolamid+Timolol), kde bol pokles nesignifikantný. Pre zvýšený (resp. plný) účinok na VOT králikov je potrebná prítomnosť voľnej, špecifickej aminokyseliny a jej interakcia s príslušným antiglaukomatikom samotným (alebo dvojkombináciou), čím vznikne nový metabolit – bioantiglaukomatikum. Treba ešte uviesť, že v zmysle výsledkov našich experimentov zmiešaním aminokyseliny a dvojkombináciou antiglaukomatík vzniknutá komponenta nemusí mať predpokladaný maximálny účinok na zníženie fyziologickej hodnoty VOT králikov.

LITERATÚRA

1. **Bito, LZ., Daga, A., Blanco, J., Camras, CB.:** Long-term maintenance of reduction intraocular pressure by daily or twice daily topical application of prostaglandins to cat or rhesus monkey eyes. *Invest. Ophthalmol Vis Sci*, 1983; 24: 312–319.
2. **Choudhri, S., Wand, M., Shields, MB.:**

- A comparison of dorzolamide-timolol combination versus the concomitant drugs. *Am J Ophthalmol*, 2000; 130: 832–833.
3. **Chuman, H., Chuman, T., Nao-I, N., Sawada, A.:** The effect of L-arginine on intraocular pressure in the human eye. *Current Eye Res*. 2000; 20: 511–516.
 4. **Harris, A., Jones-Cuypers, C.P., Kagemann, L., Nowacki, E., A., Garzoni, H., Cole, C., Martin, B.:** Effect of

dorzolamide timolol combination versus timolol 0.5% on ocular blood-flow in patients with primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*, 2001; 132: 490–495.

5. **Kahán, IL.:** *Zur Biochemie des Auges.* Akadémiai kiadó, Budapest, 1982, 113 s.
6. **Kim CY., Whittington DA., Chang JS., Liao J., May JA., Christianson DW.:** Structural aspects of isoenzyme selec-

- tivity in the binding of inhibitors to carbonic anhydrase II and IV. *Med Chem*, 2002; 45: 888–893.
7. **Oláh, Z., Veselovský, J.:** Vplyv aminokyseliny L-arginínu.HCl na aktivitu Trusoptu v komorovom moku. *Transacta Ophthalmol Slovaca*, 2003; 3, No.1: 5–8.
 8. **Oláh, Z., Veselovský, J., Gressnerová, S., Veselá, A.:** The rabbits IOP after instillation of the amino acid L-arginine.HCl and antiglaucomatic mixture. *Ophthalmic Res*, 2004; 36, S1/04: 183.
 9. **Oláh, Z., Veselovský, J., Gressnerová, S., Veselá, A. (2005a):** Vnútroočný tlak králikov po instilácii zmesi antiglaukomatika COSOPTu s aminokyselinou L-arginínom.HCl do spojkového vaku. *Čes a slov Oftal*, 2005; 61: 3–12.
 10. **Oláh, Z., Veselovský, J., Gressnerová, S., Veselá, A. (2005b):** Zmeny fyziologického VOT u králikov po aplikácii aminokyseliny lyzínu s antiglaukomatikom latanoprostom (Xalatanom). *Čes a Slov Oftal*, 2005; 61: 147–153.
 11. **Sugrue, M.F., Harris, A., Adamsons, I.:** Dorzolamide hydrochloride: A topically active, carbonic anhydrase inhibitor for the treatment of glaucoma. *Drugs of Today*, 1997; 33: 283–298.
 12. **Sugrue, M.F.:** Pharmacological and ocular hypotensive properties of topic carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Retin. Eye Res*, 2000; 19: 87–112.
 13. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselovská, Z., Veselá, A. (1998a):** Mechanizmus účinku pilokarpínu v tkanivových štruktúrach predného segmentu oka z hľadiska jeho interakcie s voľnými aminokyselinami. *Čs Oftal*, 1998; 54: 10–17.
 14. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselovská, Z., Veselá, A. (1998b):** Bioaktivita zmesi pilokarpínu s lyzínom na pupilu a vnútroočný tlak králikov. *Čs Oftal*, 1998; 54: 353–361.
 15. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S.:** Fyziologický význam interakcie timololu s voľnými aminokyselinami v štruktúrach oka. *Čes a Slov Oftal*, 2002; 58: 143–148.
 16. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S. (2003a):** The free amino acids and the aqueous humor pH after antiglaucomatics *in vitro*. *Bratisl Lek Listy*, 2003; 104: 14–18.
 17. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S. (2003b):** Zmes Timoptolu s L-arginínom.HCl: regulátor vnútroočného tlaku králikov. *Čes a Slov Oftal*, 2003; 59: 295–302.
 18. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S. (2004a):** Vnútroočný tlak králikov po aplikácii 10% L-arginínu.HCl v 2% Trusopte. *Čes a Slov Oftal*, 2004; 60: 81–88.
 19. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S. (2004b):** Reakcia fyziologického vnútroočného tlaku králika na Latanoprost (Xalatan) a jeho zmesi s aminokyselinou L-arginínom.HCl. *Čes a Slov Oftal*, 2004; 60: 319–327.
 20. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., Gressnerová, S.:** Redukcia fyziologickej hodnoty VOT zmesou 2 aminokyselín (lyzínu a arginínu) v Timoptole v experimente u králika. *Čes a Slov Oftal*, 2006; 62: 3–10.