Oftalmologie 6-09 14.12.2009 15:37 Str. 236
proLékaře.cz | 3.11.2026

FYZIOLOGICKÝ VOT KRÁLIKOV PO INSTILÁCII ZMESI AMINOKYSELÍN LYZÍNU A ARGINÍNU V TRUSOPTE

Oláh Z., Veselovský J.

Klinika oftalmológie LFUK, Bratislava, prednosta prof. MUDr. P. Strmeň, CSc.

Práca bola vypracovaná na základe podpory Grantu VEGA č. 1/0522/03.

SÚHRN

Cieľ: Zistiť účinok zmesi dvoch aminokyselín lyzínu a arginínu v Trusopte na fyziologické hladiny vnútroočného tlaku (VOT) u králikov.
Metódy: Piatim dospelým samiciam králikov plemena Novozélandský biely bola instilovaná zmes 10% L-lyzínu.2HCl.2H20 a 10% L-arginínu.HCl v 2% Trusopte. Meranie vnútroočného tlaku sa uskutočnilo pred instiláciou zmesi a 5, 15, 30, 60, 120, 180, a 240 minút po aplikácii. Pravé oko toho istého jedinca bolo kontrolné.
Výsledky: Ninhydrín pozitívnymi farebnými reakciami sme zistili, že aj dve aminokyseliny lyzín s arginínom spolu interagujú s antiglaukomatikom Trusoptom. Prejavilo sa to odlišným fialovo modrým zafarbením, oproti typickému červenému zafarbeniu oboch aminokyselín. Toto zafarbenie dokazuje vznik novej bioaktívnej látky majúca účinok na zníženie VOT.
Nová bioaktívna komponenta signifikantne znižovala VOT od 60. minúty po 240. minútu v každom časovom úseku (pokles o 4,3 torr – 19,9 % oproti kontrolnému oku). Od 5. po 40. min. v oku v pokuse sme zaznamenali nesignifikantný rozdiel v hodnote VOT (oproti kontrolnému oku). Aplikovaná komponenta od 60 minúty za tri hodiny priemerne znížila VOT o 3,1 torr (o 14,6 %). U kontrolného oka od 60 min. pozorovať mierny pokles VOT.
Závery: Bolo preukázané, že dve štrukturálne a funkčne odlišné aminokyseliny lyzín s arginínom interagujú s jedným antiglaukomatikom, karboanhydrázovým inhibítorom, Trusoptom za in vitro podmienok. Vzniká nová bioaktívna komponenta. Toto nové „bioantiglaukomatikum" signifikantne znižuje hodnoty VOT od 30. do 240. minúty.

Kľúčové slová: dôkazy interakcie lyzínu s arginínom v Trusopte ninhydrínovou reakciou, Fyziologické hladiny VOT po instilácii zmesi L-lyzínu.2HCl.2H20 s L-arginínom.HCl v 2% Trusopte.

SUMMARY

Physiologic IOP of Rabbit's after Instillation Mixture of Amino Acide Lysine and Arginine in Trusopt

Purpose: To compare the lowering effect of the topically applicated mixture of two amino acids with different mode of action – L-lysine.2HCl.2H2O and L-arginine.HCl in the anti-glaucomaticum Trusopt on the intra ocular pressure (IOP) in rabbits.
Methods: Into the left eye of the adult female rabbits of the New Zealand White species were once instilled mixture of 10% L-lysine.2HC.2H2O and 10 % L-arginine.HCl in 2 % Trusopt. The IOP and pupillary diameter were measured before the instillation and 5th, 15th, 30th, 60th, 120th, 180th, 240th min. and 24 hours after the instillation. The right eye of the same rabbit was used as control.
Results: Using ninhydrine reagent with colour reaction we detect, that the mixture of two amino acide L-lysine.2HCl.2H2O and L-arginine.HCl are in interaction with antiglaucomaticum 2 % Trusopt. The evidence is different violet-blue colour reaction in contrast to the typical red coloration the both amino acids. This coloration is evidence the new formation of a bioactive material with depressive effect on the IOP.
The new bioactive component significantly decreased the IOP values from the 60th min to 240th min (decrease the IOP levels was for 4.3 torr – 19.9 % in comparison with the control eye). From 5th to 40th min. after application the nonsignifant difference of the IOP was constated (in comparison with the control eye). The applicated component from 60 min showed for 3 hours a mean decrease of IOP for 3.1 torr (14.6 %). From the 60th min. after application the control eye showed little decrease of IOP levels.
Conclusions: In this paper we constate the two amino acids L-lysine.2HCl.2H2O and L-arginine.HCl with different structure and mode of action are in interaction with one of antiglaucomatic drugs – carboanhydrase inhibitor – the 2 % Trusopt also in vivo. Within this interaction a new bioactive substance is constated. This new "bioantiglaucomaticum" decreased significantly the IOP from 30th to 240th min.

Key words: Interaction evidence of mixture of the amino acide lysine with arginine in Trusopt using ninhydrine colour reaction. The IOP values after instillation of L-lysine.2HCl.2H2O mixture with L-arginie.HCl in 2 % Trusopt.

Čes. a slov. Oftal., 65, 2009, No. 6, p. 236–239

ÚVOD

V doterajších našich prácach na očiach králikov s fyziologickým vnútroočným tlakom sme experimentálne zistili, že väčšia sila a časová dĺžka zníženie VOT sa dosiahne spoločnou instiláciou antiglaukomatika s príslušnou aminokyselinou ako samotným antiglaukomatikom (8, 12, 13–17) .

V predkladanej práci našimi výsledkami doplňujeme a potvrdzujeme naše výsledky (15, 18, 19) v tom zmysle, že aj medzi jedným antiglaukomatikom Trusoptom (karboanhyd-

proLékaře.cz | 3.11.2026

rázový inhibítor) a dvomi aminokyselinami arginínom a lyzínom dochádza ku interakcii, pričom vzniká nová bioaktívna látka znižujúca vnútroočný tlak. Aminokyselina arginín pre živočíchov a človeka je netoxická (14). Tak literárne záznamy (3, 4, 5, 6) ako aj naše experimentálne poznatky svedčia, že jej lokálna aplikácia tak u živočíchov ako aj človeka znižuje VOT. O aminokyseline lyzín je známe, že je nepostrádateľnou pre živočíšny a ľudský organizmus (7) a na základe našich experimentov (15) neovplyvňuje fyziologické hladiny VOT králikov.

MATERIÁL A METÓDA

Experimentálne pozorovania sa uskutočnili na očiach piatich dospelých samiciach králikov plemena Novozelanský biely. Králiky o priemernej hmotnosti 2500 g boli získané zo štandardného akreditačného reprodukčného chovu č. SK-CH-29004 Slovenského centra poľnohospodárskeho výskumu – chov králikov v Nitre. Pred pokusmi boli desať dní

adaptované v miestnosti s konštantnou teplotou 20 Ī 2 ^{0}C a normálnom svetelnom režime. Boli kŕmené štandardnou kŕmnou zmesou pre králiky a voda bola im podávaná ad libitum.

Na instiláciu sa použilo:

a) Štandardné antiglaukomatikum zo skupiny karboanhydrázových izoenzýmov – CA II, inhibítor 2% Trusopt (Dorzolamidi hydrochlorici 2%), výrobok firmy Merck & Co., INC, USA, ktoré bolo sponzorované firmou ALCON.

b) Zmes antiglaukomatika 2% Trusopt s 2 aminokyselinami: L-arginínom.HCl a L-lyzínom. 2HCl.2H_2O, ktorých koncentrácia v tejto zmesi bola 10%; zmes bola pripravená v našich laboratórnych podmienkach. Aminokyselina L-arginin.HCl bola dodaná firmou Merck & Co., INC.; aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H_2O bola dodaná firmou Biotika Slovenská Lupča (vyrobená pre humánne účely).

Uvedené roztoky boli kvapnuté do ľavého spojovkového vaku jednorazovo (po dvoch kvapkách) vždy v odstupe siedmych dní pre prípadnú prítomnosť rezíduí z predchádzajúceho roztoku. Z chronobiologického hľadiska aplikovanie roztokov sme uskutočňovali vždy o 8^{00} h. Zvýšenou aplikáciou dvoch kvapiek sme chceli dosiahnuť obsadenie receptorov, transmembránových kanálov, ako aj enzymatických systémov v bunkách tých tkanivových štruktúrach oka, ktoré sú zodpovedné ako za tvorbu, tak aj odtok komorového moku. Pravé oko toho istého králika nebolo ovplyvnené žiadnym roztokom a slúžilo ako kontrolné.

Meranie vnútroočného tlaku (VOT) sa uskutočňovalo pred kvapnutím roztokov a v 5., 15., 30., 60., 120., 180. a 240. minúte po ich aplikácii kontaktným tonometrom Schiötza; hodnoty sa preverovali aplanačným tonometrom Maklakova, resp. TONO PEN XL firmy Medtronic Solan, USA.

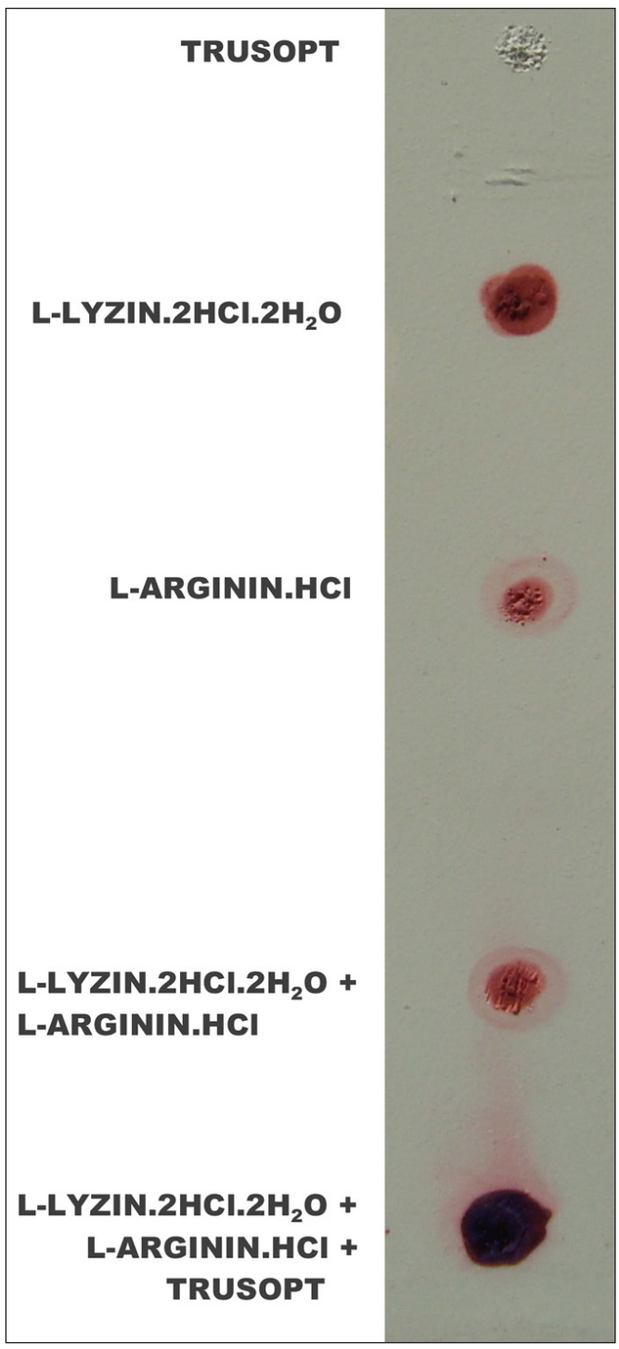
Lokálnu anestéziu sme realizovali pred každým meraním VOT aplikáciou 2% Mesocainu, pripraveného v Ústavnej lekárni FN v Bratislave. VOT bol meraný vždy tou istou osobou.

Zaznamenané hodnoty boli vyhodnotené pomocou Studentovho t-testu.

VÝSLEDKY

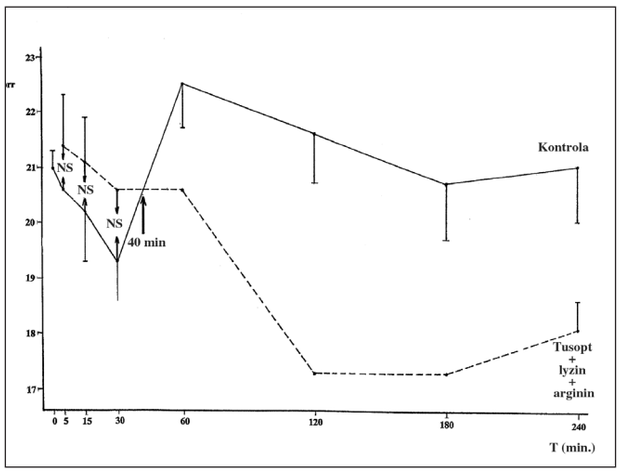
Interakčné dôkazy

V našich experimentoch sme najprv zistili či antiglaukomatikum Trusopt (inhibítor karboanhydrázy –CAII) vykazuje interakciu naraz s dvomi štrukturálne a funkčne odlišnými voľnými aminokyselinami, s L-lyzínom a L-argininom. Roztoky, uvedené v kapitole Materiál a metodika, sme naniesli v množstvách 60 Ķl na tenkovrstevnú sklenenú chromatografickú platňu (Merck) a po ich vysušení teplým vzduchom sme zafarbili organickým činidlom ninhydrínom, selekčným pre voľné aminokyseliny a peptidy. Aminokyseliny lyzin a arginín ako aj ich zmesi sa farbili typicky červeno; antiglaukomatikum Trusopt neprejavil žiadnu ninhydrín pozitívnu reakciu (nefarbil sa). Zmes týchto dvoch aminokyselín s Trusoptom vykazovala odlišné fialovo modré zafarbenie, ktoré je typické pre komponenty peptidického charakteru (obr. 1).



Obr. 1. Výsledok vyšetrenia ninhydrínovým činidlom na prítomnosť voľných aminokyselín a peptíd na tenko vrstevnej chromatografii (vysvetlenie v texte).

proLékaře.cz | 3.11.2026



Graf 1 Záznam priebehu zmien VOT na oku králikov po kvapnutí zmesi 10 % L-arginínu.HCl a 10 % L-Lyzínu.2HCl.2H2O v 2 % Trusopte v porovnaní s kontrolným okom.

Dynamika fyziologického vnútroočného tlaku králikov po instilácii zmesi 10 % L-argiří-nu.HCl a 10 % L-Lyzínu.2HCl.2H2O v 2 % Trusopte (graf 1)

Do spojovkového vaku králika aplikovaná zmes aminokyselín lyzínu s arginínom v 2% Trusopte v porovnaní s kontrolným okom od 5. minúty po 30. minútu nepreukazne ovplyvnila hladinu VOT. Najväčší rozdiel VOT v ovplyvnenom oku oproti kontrolnému bol v 30. minúte (o 1,3 torr). Od 30. min. po 60. min. VOT na ovplyvnenom oku zostáva na hodnote 20,6 Ī 0,0 torr. V priebehu ďalšej hodiny zaznamenávame na tomto oku výrazný pokles VOT o 3,3 torr, ktorý zostával na tej istej úrovni nezmenene až po 180. minútu. Od tohto času po 240. minútu VOT sa zvýšil o 0,8 torr. Od 60. minúty po 240. minútu v každom časovom úseku zmes signifikantne znižovala VOT oproti kontrolným očiam. Najväčší účinok tejto zmesi bol zaznamenaný v 120. minúte (pokles o 4,3 torr, t. j. o 19,9 % oproti kontrolnému oku). Treba tu poukázať na 40. minútu, kedy bolo zistené pretínanie hodnôt VOT kontrolného oka s okom ovplyvneným. Uvedené výsledky jasne dokumentujú, že účinok aplikovanej zmesi na zníženie VOT sa prejavil už od 60. minúty. Od tohto času za celé tri hodiny priemerne zmes znížila VOT o 3,1 torr (o 14,6 %).

VOT na kontrolnom oku v 60. minúte dosiahol najvyššiu hodnotu 22,5 Ī 0,8 torr; od tohto času až po 240. minútu bol zistený jeho pokles.

DISKUSIA

V doterajších prácach uvedené naše experimentálne zistenia svedčia o vyššom efekte antiglaukomatík aplikovaných spolu s aminokyselinami, ktorý sa prejavil pri znížení fyziologických hladín vnútroočného tlaku. Farebnými ninhydrínovými reakciami sme preukázali, že antiglaukomatikum s aminokyselinou už za in vitro podmienok interaguje za vzniku novej komponenty (11, 16, 17). Pritom sa ukázalo, že len určitá aminokyselina s určitým antiglaukomatikom dáva vznik novej komponente, ktorá signifikantne počas 24 hodín udržuje zníženú fyziologickú hladinu VOT.

Uvedenú skutočnosť potvrdzujú aj terajšie naše predkladané výsledky realizované použitím zmesi Trusoptu a dvoch aminokyselín – lyzínom a arginínom. I v tomto prípade farebné reakcie dokazujú ich interakčný vzťah za vzniku novej komponenty. Avšak účinok tejto novej komponenty je pri znížení fyziologického VOT králikov nižší o 1 torr v porovnaní so samotným Trusoptom (13), o 3,5 torr oproti zmesi Trusoptu s arginínom (14), o 2,9 torr v porovnaní s účinkom zmesi Timoptolu s lyzínom a arginínom (16), o 1,5 torr oproti účinku samotného arginínu (14), o 1,1 torr v porovnaní so zmesou arginínu s lyzínom (13) a o 1,7 torr oproti účinku zmesi latanoprostu s lyzínom a arginínom (18). Tieto výsledky korelujú s klinickou praxou oftalmológie, že ani samotné lokálne aplikované antiglaukomatiká nemajú vždy rovnako silný a časovo rovnako trvajúci účinok.

Toto nové bioantiglaukomatikum po aplikácii v čase od 5. minúty po 40. minútu nesignifikantne ovplyvní VOT (oproti kontrolnému oku). Avšak v 40. minúte pretínanie hodnôt hladín VOT kontrolného a ovplyvneného oka svedčí o prudkom poklese VOT v pokusnom oku. Doterajšie nám dostupné literárne pramene a ani oftalmologická prax nezdôrazňujú, že antiglaukomatikum v prvých minútach po instilácii zvyšuje hladinu VOT. V ďalších našich experimentálnych prácach bude potrebné mechanizmus tejto skutočnosti objasniť.

V doterajších našich prácach sme študovali mechanizmy účinku jednotlivých antiglaukomatík. Zistili sme, že tieto mechanizmy majú spoločného menovateľa, v podobe interakčne vzniknutých biologicky aktívnych komponent, ktoré majú selekčne špecifické účinky na hladinu vnútroočného tlaku. Tieto nálezy sú podmienené s použitím príslušnej (nami vybranej) aminokyseliny. Podľa nášho názoru je potrebné doplniť tieto vysvetlenia a zároveň zodpovedať na otázku selekčnej špecifičnosti účinku novej komponenty.

K tomu, aby sa udržali fyziologické hladiny VOT je potrebná rovnováha medzi rýchlosťou tvorby komorového moku ciliárnym epitelom a rýchlosťou jeho odtoku trabekulárnym systémom a Schlemmovým kanálom a sčasti aj suprachoroidálnou cestou. Tento transport komorového moku sa uskutočňuje cez plazmatické membrány epiteliálnych a endoteliálnych buniek. Avšak tak jeho tvorba ako aj odtok sú význačne uľahčené transmembránovými proteínovými vodnými kanálmi – aquaporínami [AQP] (19, 10, 21). AQP sa odlišujú sa tkanivovou selekčnosťou a funkčnou špecifičnosťou. V tkanivových štruktúrach oka sa zistilo päť AQP (10).

V nepigmentovanom epitelu vráskovca zodpovedného za tvorbu komorového moku, sú prítomné AQP 1 a AQP 4, pričom prítomnosť AQP 4 bol zistený v menšej miere (2). Prítomnosť oboch kanálov bola dokázaná aj v endoteliálnych bunkách trabekulárnej trámcoviny (11) a AQP 1 aj v endoteli Schlemmovho kanála (2). Hamann a kol. (2) uvádzajú, že nepigmentované epiteliálne bunky vráskovca sú miestom pôsobenia aj rôznych enzýmov ako Na^+,K^+- ATPáza, adenylcykláza a karboanhydráza, ktoré významnou mierou tiež participujú v rýchlosti produkcii komorového moku. Rozdielnosť účinkov jednotlivých interakčne vzniknutých metabolitov ako aj samotných prípravkov na ovplyvnenie VOT (t.j. antiglaukomatík) vidíme v ich nerovnakom funkčnom vzťahu ku prítomným aquaporínom tak v nepigmentovanej vrstve vráskovca ako aj v odvodných tkanivových štruktúrach oka. Podľa Hamanna a kol. (2) vodné kanále AQP 1 v nepigmentovanom epitely vráskovca majú jasnú úlohu v produkcii komorového moku. V rozdielnom vplyve týchto aplikovaných antiglaukomatík, resp. ich metabolitov spočíva ich selekčná špecifičnosť pri úprave VOT. Domnievame sa, že mechanizmus účinku týchto metabolitov spočíva v nerovnakej inhibícii najmä AQP 1 a to tak vo vráskovci ako aj v trabekulárnej trámčine. Túto skutočnosť potvrdzujú aj údaje Wanga a kol. (20) a Verkmana (10), ktoré hovoria, že VOT sa signifikantne znížil so znížením tvorby tekutiny u myší deficitných na AQP 1 a/alebo AQP 4. Skutočnosť, že tieto metabolity majú odlišné účinky na VOT svedčí aj o ich jednak odlišnej chemickej štruktúre ako aj o ich odlišnej štruktúre od pôvodných komponent (antiglaukomatík a aminokyselín). Aj v tomto vidíme ďalšiu možnú ich selekčnú špecifičnosť, ktorú je nutné brať do úvahy pri syntéze nových látok znižujúcich

Oftalmologie 6-09 15.12.2009 12:32 Str. 239
proLékaře.cz | 3.11.2026

VOT. Vychádzame pritom z predpokladu, že prípade nižšieho účinku antiglaukomatika s aminokyselinou ako samotného antiglaukomatika pri znížení VOT, je potvrdením skutočnosti vzniku metabolitu, ktorý neovplyvňuje cez aquaporíny tvorbu resp. aj odtok komorového moku. V prípade inhibícii oboch aquaporínov účinkom nového metabolitu je zníženie VOT signifikantné. Túto skutočnosť potvrdzuje práca Dibasa a kol. (2008), ktorí uvádzajú, že zvýšenie VOT je dôležitý faktor zvýšenia hladín AQP 4.

Vychádzajúc z našich výsledkov ako aj uvedených skutočností predpokladáme, že práve inhibícia aquaporínov selekčne špecifickými komponentami môže poskytnúť nový prístup pri úprave a regulácii VOT.

LITERATÚRA

1. **Han ZB., Yang JB., Wax MB., Patil RV.**: Molecular identifikation of functional water channel protein in cultured human nonpigmented ciliary epithelial cells. Curr. Eye Res., 20, 2000: 242–247.
2. **Hamann S.**, **Zeuthen T., La Cour M., Nagelhus EA.,** 3. **Ottersen O P., Agre R., Nielsen, S.**: Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 274, 1998: 1332–1345.
3. **Chiou GYC., Liu SXL., Li BHR., Chiang CH., Varma RS.**: Ocular hypotensive effect of L-arginine and its derivates and their actions on ocular blood flow. J. Ocul. Pharmacol. and Therapeut., 11, 1995: 1–10.
4. **Chuman H., Chuman T., Nao-IM., SAWADA A.:** The effect of L-arginine on intraocular pressure in the human eye. Current Eye Res., 20, 2000: 511–516.
5. **Kotikoski H.**, **Alajuuma P., Moilanen E., Salmenpera, P., Oksala O., Lapippala AP., Vapaatalo H.:** Comparison of nitrice donors in lowering intraocular pressure in rabbits: role of cyclic CMP. J. Ocul. Pharmacol. Ther., 18, 2002: 11–13.
6. **Liu SX., Chiou GC., Varma RS.:** Improvement of retinal functions after ischemia with L-arginine and its derivates. J. Ocul. Pharmacol. Ther., 11, 1995: 261–265.
7. **Müller Z.:** Aminokyseliny ve výživě zvířat. SZN, Praha, 1969: 371.
8. **Oláh Z., Veselovský J., Veselá A., Gressnerová S.:** Odpoveď fyziologického vnútroočného tlaku králikov na latanoprost s aminokyselinou glycín. Čes. a slov. Oftal., 63, 2007: 3–9.
9. **Takata K., Matsuzaki T., Tajika Y.:** Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. Prog. Histochem. Cytochem., 39, 2004: 1–83.
10. **Verkman AS.:** Role of aquaporin water channels in eye function. Review. Exp. Eye Res., 76, 2003: 137–143.
11. **Veselovský J., Oláh Z., Veselovská Z., Veselá A.:** Mechanizmus účinku pilokarpínu v tkanivových štruktúrach predného segmentu oka z hľadiska jeho interakcie s voľnými aminokyselinami. Čs. Oftal., 54, 1998: 10–17.
12. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., Gressnerová S.:** Zmes timoptolu s L-arginínom.HCl: regulátor vnútroočného tlaku u králikov. Čes. a slov. Oftal., 59, 2003: 296–302.
13. **Veselovský J., Oláh Z**.: Účinnosť zmesi Timoptolu s Lyzínom a Arginínom na fyziologickú hladinu VOT králikov. Transac. Ophtal. slov., 4, 2004: 11–14.
14. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., Gressnerová S.:** Vnútroočný tlak králikov po aplikácii 10% L- arginínu.HCl v 2% Trusopte. Čes, a slov. Oftal., 60, 2004: 81–88.
15. **Veselovský J., Oláh Z., Gressnerová S., Veselá A.:** Účinok zmesi aminokyseliny L-lyzínu v antiglau-komatiku Timoptole na vnútroočný tlak a pupilu králikov. Čes. a slov. Oftal., 61, 2005: 88–95.
16. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., Gressnerová S.:** Redukcia fyziologickej hodnoty VOT zmesou 2 aminokyselín (lyzínu a arginínu) v Timoptole v experimente u králikov. Čes. a slov. Oftal., 62, 2006: 3–10.
17. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., Gressnerová S.:** Účinok glycínu s Timoptolom na fyziologické hodnoty VOT králikov. Čes. a slov. Oftal., 62, 2006: 247–254.
18. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., Gressnerová S.:** Regulácia VOT králikov topickou instiláciou zmesi antiglaukomatika latanoprostu s aminokyselinami arginínom a lyzínom. Čes. a slov. Oftal., 63, 2007a: 75 – 81.
19. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A.:** VOT králikov po aplikácii aminokyselín taurínu a arginínu s betablokátorom Timoptolom. Čes. a slov. Oftal., 63, 2007b: 320–324.
20. **Wang F., Feng XE., Li Y., Yang H., Ma T.:** Aquaporins as potential drug targets. Acta Pharmacol. Sinica. 27, 2006:396 – 401.
21. **Zhang D.**, **Vetrivel L., Verkman AS.:** Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production. J. Gen. Physiol., 119, 2002: 561–569.

Do redakce doručeno dne 6. 4. 2009
Do tisku přijato dne 26. 10. 2009

Emeritný profesor
MUDr. Zoltán Oláh, DrSc.
Klinika oftalmológie LF UK v Bratislave
FNsP Bratislava, pracovisko Ružinov
Ružinovská 6
826 06 Bratislava
e-mail: olah@ružinov.fnspba.sk

OČNÍ ORDINACE V BRNĚ

Kompletně moderně zařízená
okamžitě k pronájmu

Tel.: 541 425 411