

Účinek zmesi aminokyseliny L-lyzínu v antiglaukomatiku Timoptole na vnútroočný tlak a pupilu králikov

Veselovský J., Oláh Z., Gressnerová S., Veselá A.

Katedra živočíšnej fyziológie a etológie PriF UK, Bratislava, SR,
vedúci doc. RNDr. M. Zeman, DrSc.
Klinika oftalmológie LF UK, Bratislava, SR,
prednosta prof. MUDr. P. Strmeň, CSc.

Súhrn

Cieľ: V predkladanej práci autori venujú pozornosť ovplyvneniu fyziologických hodnôt vnútroočného tlaku po aplikácii zmesi 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole.

Metódy: Do spojkového vaku ľavého oka 5 dospelých králikov (samiciach plemena Novozélandský biely) sa instiloval v týždňovom odstupe 10% L-lyzín.2HCl.2H₂O, 0,5% Timoptol a zmes 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole. VOT a šírka pupily sa merali 5, 15, 30, 60, 120, 180 a 240 minút po instilácii. Pravé oko bolo kontrolné.

Výsledky: Bolo zistené, že: a) aminokyselina 10% L-lyzín.2HCl.2H₂O neovplyvní fyziologickú hodnotu VOT; b) 0,5% Timoptol v porovnaní s kontrolným okom počas štyroch hodín experimentu nesignifikantne sa znížil VOT; c) zmes oboch látok znižuje fyziologický VOT v dvoch fázach. Prvá fáza nesignifikantného zníženia trvá od aplikácie až po 60. minútu. V tomto období zhodný priebeh bol aj u kontrolného oka. Druhá fáza trvá od 60. minúty do konca experimentu (do štyroch hodín), kedy pozorovať oproti kontrolnému oku vysoko signifikantný účinok uvedenej zmesi. Prejaví sa 3,3-torrovým poklesom fyziologickej hodnoty VOT, pôsobenie na tejto úrovni má rovnomerný a priamočiary charakter. Na kontrolnom oku sa druhá fáza poklesu VOT neprejaví.

Záver: Výsledky dokazujú, že samotný Timolol len nesignifikantne znižuje fyziologické hodnoty VOT, aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H₂O na VOT nepôsobí. V práci sa potvrdilo, že v zmesi 10% L-lyzín. 2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole interakciou vzniká nová látka, špecifické „bio-antiglaukomatikum“, ktoré vysoko signifikantne znižuje fyziologickú hodnotu VOT.

Kľúčové slová: pôsobenie zmesi L-lyzínu.2HCl.2H₂O a 0,5% Timoptolu na VOT králikov, ovplyvnenie fyziologického VOT králikov „bio-antiglaukomatikom“

Summary

The Rabbit IOP and Pupil Values after Application of Aminoacid L-lysine and Antiglaucomatic Timoptol Mixture

Objective: In this article authors focused to influence the physiologic IOP values after application of the aminoacid 10% L-lysine.2HCl.2H₂O in 0.5 % Timoptol eye drops mixture in experiments.

Methods: 0.5% Timoptol, followed by 10% L-lysine.2HCl.2H₂O and mixture of 10% L-lysine.2HCl.2H₂O with 0.5 % Timoptol was instilled weekly into the left conjunctival sac of 5 adult rabbits (females of the New Zealand White species).

The IOP and pupilar diameter were measured in 5,15,30,60,120,180 and 240 min. after instillation. The right eye was used as control.

Results: In experiments authors observed that: a) the aminoacid 10% L-lysine.2HCl.2H₂O is without influence on the physiologic value of the IOP; b) 0.5 % Timoptol compared with control eye nonsignificantly decreased the rabbit IOP; c) after instillation of 10% L-lysine.2HCl.2H₂O and 0.5 % Timoptol mixture the IOP showed decrease of the physiologic IOP in two periods. The initial non-significant period of the IOP decrease was measured after application up to the 60th min. The identical values were also in the control eye. However, the major decrease of the IOP compared with control eye was observed during the second period starting from 60th min. up to the end of experiments (to the 4th hour) after instillation of this mixture. The mean value of this significant decrease was 3.3 torrs of the physiologic IOP value showing regular and linear effectivity in the experimental eye. In the control eye the second period was without decrease of the IOP.

Conclusions: The results demonstrate that the Timolol alone decreased the physiologic IOP no significantly, the aminoacid L-lysine.2HCl.2H₂O is without influence on the physiologic value of the IOP. In experiments we confirmed that in a mixture of aminoacid L-lysine.2HCl.2H₂O with antiglaucomatic 0.5 % Timoptol a new substance was created, a new "bio-antiglaucomatic", responsible for more significant decrease of the physiologic IOP.

Key words: the rabbit IOP influence with L-lysine.2HCl.2H₂O and Timolol mixture, the effectivity of the "bio-antiglaucomatic" on physiologic IOP of the rabbits

Čes. a slov. Oftal., 61, 2005, No. 2, p. 88-95

ÚVOD

V doterajších našich experimentálnych prácach sme zistili interakciu anti-glaukomatík s voľnými aminokyselinami za vzniku novej bioaktívnej substancie. Táto bioaktívna substancia má väčší účinok pri znížení fyziologickej hladiny vnútroočného tlaku (VOT) u králikov, ako pôvodné anti-glaukomatiká. V našich prácach (5, 6) sme zistili, že interakcia voľných aminokyselín s anti-glaukomatikami má špecifický charakter. Vzhľadom na klinický význam, sme sa venovali problematike interakcie aminokyseliny L-arginínu.HCl v kombinácii s niektorými anti-glaukomatikami (Timolol, Trusopt, Xalatan), používanými v monoterapii a výsledkami sme túto skutočnosť opätovne potvrdili (8, 10 a 11). Naše záznamy nás opravňujú vysloviť záver, že pri interakcii aminokyselín s anti-glaukomatikami vznikajúca fyziologicky účinná látka je „bio-anti-glaukomatikum“, ktoré hrá hlavnú úlohu už v znížení aj fyziologickej hladiny VOT.

V tejto práci sme si položili za cieľ potvrdiť špecifičnosť aminokyselín pri vzniku „bio-anti-glaukomatika“ použitím ďalšej aminokyseliny L-lyzínu.2HCl.2H₂O. Je to esenciálna aminokyselina pre živočíchy a človeka a rozhoduje o využití ostatných aminokyselín pre syntézu peptidov a bielkovín. Sústredili sme sa na efektivitu zmesi tejto aminokyseliny s neselektívnym β-blokátorom Timoptolom pri ovplyvnení VOT. Nám prístupné literárne pramene sa doteraz nezmieňujú o fyziologickom význame a funkciách tejto aminokyseliny v tkanivových štruktúrach a tekutinách oka.

MATERIÁL A METÓDA

Použitý biologický experimentálny materiál

Zmeny hladiny VOT a veľkosť priemeru pupily sme sledovali u piatich dospelých králikoch – samiciach plemena Novozélandský biely, získaných zo štandardného chovu Výsk. ústavu živočíšnej výroby v Nitre. Králiky sa desať dní adaptovali na prostredie a počas experimentov mali podmienky s konštantnou teplotou 20 °C a normálnym svetelným režimom, boli kŕmené štandardnou krmnou zmesou a voda im bola podávaná ad libitum.

Použitie instilované roztoky

Pri experimentoch sme použili:

- antiglaukomatikum zo skupiny neselektívnych β -blokátorov 0,5% Timoptol (Timololi maleas, výrobok fy. Léčiva, ČR),
- diaminodikarbonovú – zásaditú aminokyselinu L-lyzín, ktorá bola pre humánne účely vyrobená firmou Biotika, Slovenská Lupča, vo forme L-lyzín. 2HCl.2H₂O. Z nej sme pripravili v aqua pro injectione roztok v 10% koncentrácii.
- zmes aminokyseliny 10 %L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole.

Spôsob aplikácie roztokov

Uvedené roztoky sme aplikovali do spojovkového vaku ľavého oka vždy o 8.00 h jednorazovo po dvoch kvapkách. Vzhľadom na skutočnosť, že oko králika je asi o polovicu menšie ako ľudské, použili sme zvýšené množstvo roztokov. Takto sme chceli obsadiť všetky receptory tkanivových štruktúr, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe a odtoku komorového moku.

Pravé oko toho istého jedinca, ktoré nebolo ovplyvnené žiadnym roztokom, slúžilo ako kontrolné.

Z hľadiska možných rezíduí sme medzi kvapkaním ďalšieho roztoku dodržali vždy odstup jedného týždňa.

Spôsob merania VOT a veľkosti pupily

VOT a priemer pupily sme hodnotili v čase 5, 15, 30, 60, 120, 180 a 240 minút od instilácie.

VOT sme merali tonometrom Schiötza, aplanančným tonometrom Maklakova a kontrolovali aj aplanančným tonometrom „TONO-PEN XL“ fy Medtronic SOLAN, USA. Hodnoty pri uvedených spôsoboch merania VOT neboli odlišné. Priemer pupily sme stanovovali v mm (vertikálne a horizontálne) pravítkom a keratometrom (s vnútorným osvetlením).

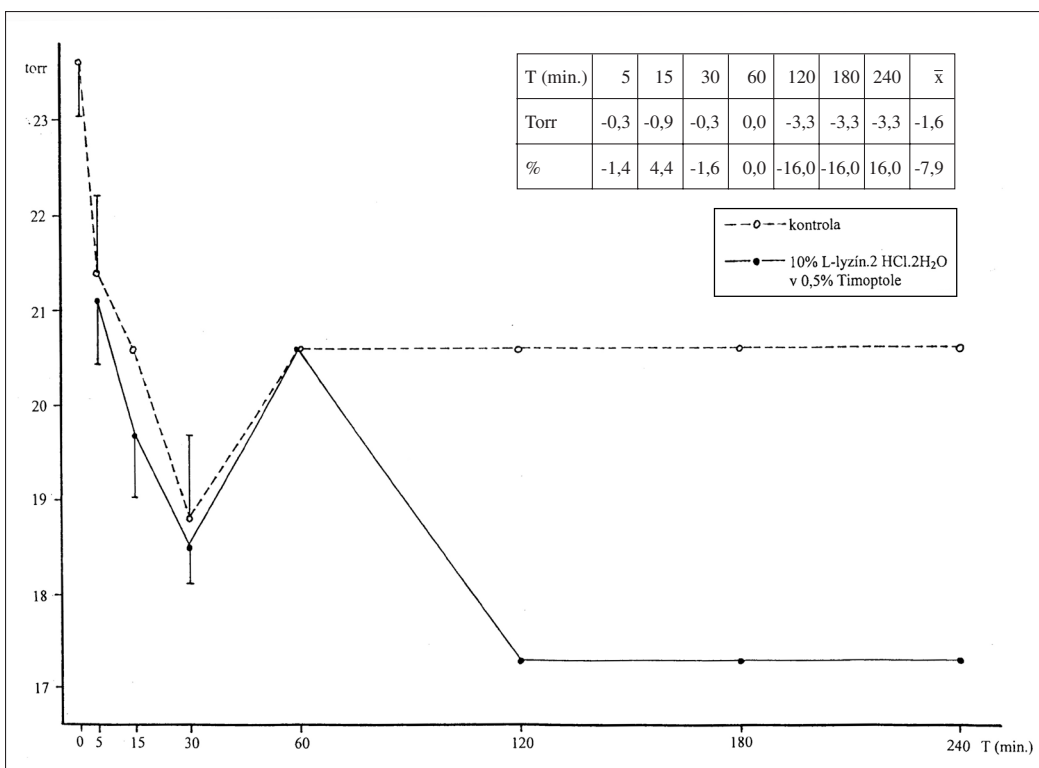
Štatistické zhodnotenie

Namerané hodnoty sme vyhodnotili Studentovým t-testom.

VÝSLEDKY

VOT a pupila po aplikácii zmesi 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole

Výsledky uvedené na obr. 1 a tabuľke jednoznačne dokazujú, že zmes aminokyseliny 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O s 0,5% Timoptolom ovplyvňuje fyziologické hladiny VOT v smere jeho poklesu oproti kontrolnému oku. Zníženie VOT sledované počas štyroch hodín, má bifázický charakter. Počas prvej fázy je pomerne veľký pokles VOT (oproti kontrolnému oku nesignifikantné) bol zaznamenaný v 30. minúte. Tento pokles oproti 5. minúte, kedy sa účinok zmesi prejavil, ale nesignifikantne, predstavuje 2,6 torra. Je zaujímavé, že aj u kontrolného oka zaznamenávame pokles VOT



Obr. 1. Účinok 10% L-lyzínu.2HCl.H₂O v 0,5% Timoptole na VOT králikov Novozélandský biely. \pm stredná chyba priemeru; n = 5. V tabuľke sú uvedené hodnoty (v torroch a v %) poklesu VOT

rovnakého charakteru a priebehu od 5. minúty po 30. minútu. V tomto časovom úseku u tohto oka pokles VOT dosahuje hodnotu tiež 2,6 torra. Od 0. do 30. minúty zaznamenávame pokles 4,8 torra. Od 30. minúty po 60. minútu bol pomerne prudký vzostup VOT a to tak u kontrolného oka (o 1,8 torra) ako aj oka ovplyvneného zmesou aminokyseliny s antiglaukomatikom (o 2,1 torra). Pokladáme za potrebné zdôrazniť, že hladiny VOT oboch očí v 60. minúte sú rovnaké (20,6 \pm 0,00 torra).

V 60. minúte sa začína druhá fáza pôsobenia zmesi L-lyzínu.2HCL.2H₂O v 0,5% Timoptole, kedy sa v oku králika po instilácii prudko znížil VOT (o 3,3 torra) až po 120. minútu. Od tohto času hladina VOT až do 240. minúty sa nemenila a mala lineárny priebeh. Najväčší 16% pokles oproti kontrolnému oku začína v 120. minúte a trvá do 240. minúty. Priemerný pokles VOT za štyri hodiny predstavuje 7,9 %.

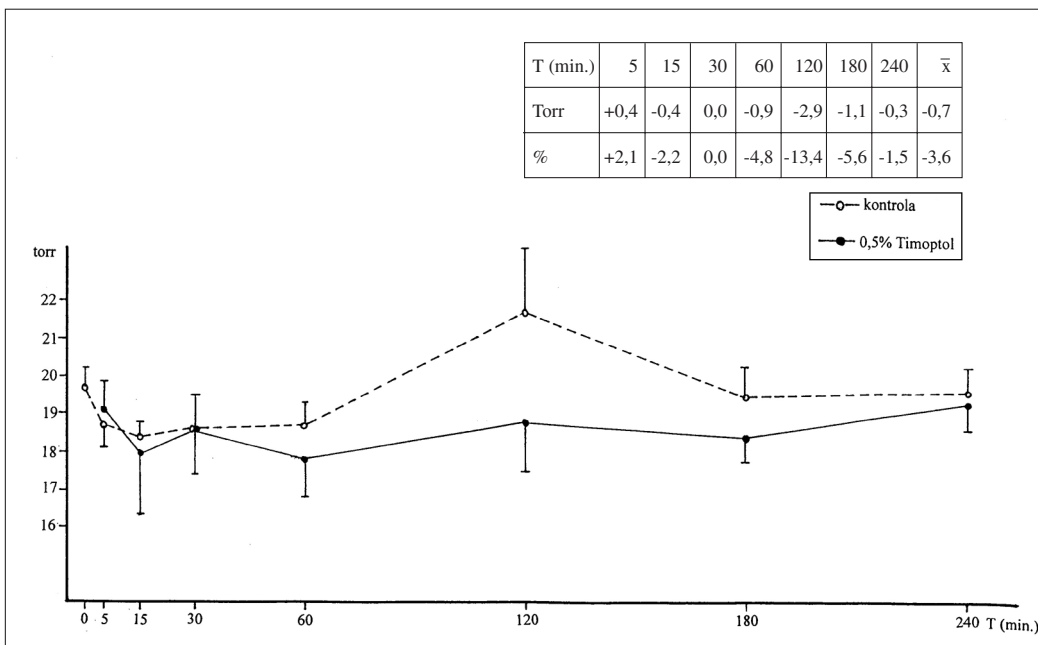
U kontrolného oka počas druhej fázy pôsobenia uvedenej zmesi sa hladina VOT až do konca pokusu už nemenila, ostávala stále na úrovni hodnoty v 60. minúte, t. j. na hladine 20,6 torra. a mala lineárny charakter. Avšak nedosiahla hodnotu VOT pred pokusom, teda 23,6 torra.

Veľkosť pupily bol takmer rovnaký; kontrolné oko malo 7,7 mm; pokusné oko malo 7,5 mm.

VOT a pupila po aplikácii 0.5% Timoptolu

Fyziologická hladina VOT ako to dokumentuje obr. 2 a tabuľka po aplikácii 0,5% Timoptolu v porovnaní s kontrolným okom počas štyroch hodín experimentu sa nesignifikantne znížila. V 30. minúte zaznamenávame rovnaké hodnoty VOT (18,6 torra) u kontrolného aj u oka v pokuse. Od 30. minúty do 60. minúty dochádza k miernemu poklesu (o 0,8 torra); potom má hladina VOT až do 180. minúty takmer lineárny priebeh. V 180. minúte je mierny vzostup VOT, ktorý však ani v 240. minúte nedosiahol hodnoty VOT kontrolného oka. Zaujímavý je 13,4% rozdiel oproti kontrolnému oku v 120. minúte.

Veľkosť priemeru pupily 0,5% Timoptol u oboch očí nezmenil; priemerná hodnota bola 7,3 mm.



Obr. 2. Účinok 0,5% Timoptolu na VOT králikov Novozélandský biely.
± stredná chyba priemeru; n = 5. V tabuľke sú uvedené hodnoty
(v torroch a v %) poklesu VOT

VOT a pupila po aplikácii 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O

Počas celého štvorhodinového pokusu zaznamenávame, že táto aminokyselina aplikovaná samotne nezmenila hladinu VOT. Hodnota zostávala na úrovni 23,6 torra. Veľkosť priemeru pupily počas celého experimentu bola 7,3 mm.

DISKUSIA

Napriek každodennému používaniu β -blokátorov v lokálnej liečbe primárneho glaukómového ochorenia s otvoreným uhlom sa v nám dostupnej literatúra nevenuje dostatočná pozornosť ich vzťahu k bielkovinám. Na túto skutočnosť sme upozornili už v štúdiu venovanej mechanizmu účinku Timoptolu na základe jeho interakcie s voľnými aminokyselinami a bielkovinami (7). Na základe našich zistení použitím farebných reakcií s ninhydrinom sa nám súčasne potvrdila skutočnosť svedčiaca o pevnej kovalentnej väzbe a zároveň o zmene štruktúry tak Timoptolu, ako aj aminokyseliny L-lyzínu, za vzniku nového metabolitu. Interakciu Timoptolu a voľných aminokyselín za vzniku nového metabolitu v našich experimentoch potvrdila aj zmena hladiny rádioaktivity aminokyseliny Na[I¹²⁵]tyrozínu po zreagovaní s Timoptolom. Rozsah týchto interakčných zmien je podľa našich zistení u každej aminokyseliny špecifický. Pritom sa opierame na poznatky autorov (1), ktorí uvádzajú, že každý liek v živočíšnych tkanivových štruktúrach musí najprv z hladiska transportu byť naviazaný na bielkovinu a po uvoľnení, len ako neviazaný môže byť metabolizovaný na biologicky účinnú formu.

V ďalšom štúdiu (9) sme prezentovali skutočnosť, že antiglaukomatikum zo skupiny neselektívnych beta blokátorov – Timoptol má na zníženie fyziologickej hladiny VOT väčší účinok pri aplikácii v zmesi s aminokyselinou 10% L-arginínom.HCl. Uviedli sme, že zvýšený hypotenzný účinok vo fyziologických podmienkach spočíva v interakčne vzniknutom metabolite, ktorý sa prejavuje práve blokovaním adrenergného sympatického nervového systému. Je to v súlade s názorom (4), že adrenergný nervový systém hrá podstatnú úlohu v regulácii VOT a vazokonstrikčne pôsobí na cievy vráskovca.

V tejto práci predkladáme zistenia, že tento Timoptol v zmesi s ďalšou, a to diaminodikarbonovou – zásaditou aminokyselinou L-lyzín.2HCl.2H₂O, má na zníženie fyziologických hladín VOT králikov od 120. minúty oproti kontrolnému oku takmer zhodný účinok so zmesou 10% L-arginínu.HCl v 0,5% Timoptole (9). Rozdiel spočíva v tom, že od 120. minúty zmes 10% L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole až do 240. minúty hodnotu VOT udržiava sa na rovnakej hladine. Táto skutočnosť podľa nášho názoru potvrdzuje prítomnosť novovzniknutého špecifického „bio-antiglaukomatika“. V tomto prípade má však odlišný charakter ako „bio-antiglaukomatikum“, ktoré vzniká v zmesi s aminokyselinou L-arginín.HCl (9). Zdôvodňujeme to skutočnosťou, že aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H₂O všeobecne pozitívne ovplyvňuje vegetatívnu nervovú sústavu a rozhoduje o úprave fyziologických procesov v tkanivových štruktúrach, najmä však v nepigmentovaných bunkách výbežkov vráskovca. Dôležitú regulačnú úlohu tohoto „bio-antiglaukomatika“ vidíme v udržaní nižších fyziologických hladín tvorby komorového moku. Predpokladáme preto, že toto bio-antiglaukomatikum, ktoré vzniklo v interakcii s touto pre ľudský organizmus esenciálnou aminokyselinou, je súčasne aj dôležitým regulátorom prísunu voľných aminokyselín do komorového moku. Zároveň pôsobí aj ako regulátor časovo dlhšieho udržania fyziologických hodnôt pH tak v komorovom moku, ako aj v ostatných tkanivových

štruktúrach oka (8). Keďže táto aminokyselina rozhoduje o metabolickom využití ostatných aminokyselín prichádzajúcich do organizmu i vo forme bielkovín (3), predpokladáme, že špecifičnosť tohto „bio-antiglaukomatika“ spočíva i v tejto činnosti.

Na základe našich výsledkov zo sledovania zmien fyziologickej hodnoty VOT na očiach králikov po aplikovaní zmesi aminokyseliny L-lyzínu.2HCl.2H₂O a Timoptolu usudzujeme, že v ich zmesi vzniknuté „bio-antiglaukomatikum“ má aj protektívny účinok na gangliové bunky retiny a ich axóny, pretože v tkanivových štruktúrach a tekutinách oka zamedzí zvýšeniu hladiny kyseliny glutamovej. Keďže sme zistili aj zníženie hodnôt pH v komorovom moku (8), predpokladáme, že reguluje aj prísun vápnikových iónov do gangliových buniek retiny. Zodpovedá to názorom (3), podľa ktorých aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H₂O má dôležitú úlohu i pri transporte a vstrebávaní vápnika v živočíšnom organizme. Keďže sama aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H₂O je nepostrádateľná pre udržanie života a znížovanie toxicity tak u živočíchov, ako aj človeka, predpokladáme, že v zmesi tejto aminokyseliny a antiglaukomatika vzniknuté „bio-antiglaukomatikum“ môže spĺňať túto funkciu nielen pre gangliové bunky sietnice, ale aj pre všetky tkanivové štruktúry oka. Pokladáme za potrebné zdôrazniť, že sama aminokyselina 10% L-lyzín.2HCl.2H₂O po instilácii do spojkového vaku počas štyroch hodín experimentu neovplyvnila hladinu VOT, a preto nemôžeme uvažovať ani o synergickom a ani o aditívnom účinku týchto dvoch komponent. Literárne údaje síce hovoria, že L-lyzín aplikovaný napr. so salicylátmi spôsobuje ich rýchlejšiu absorpciu a časovo rýchlejšiu a vyššiu účinnosť (2). I v tomto prípade uvažujeme o špecifickom interakčnom vzťahu za vzniku nových fyziologicky vysoko aktívnych látok, ktoré sú ľudským organizmom, podobne ako aj nové „bio-antiglaukomatikum“, dobre tolerované, ľahko a rýchlo absorbované. Preto predpokladáme, ako to dokumentuje aj náš grafický záznam, vysokú a dlhotrvajúcu účinnosť tohto „bio-antiglaukomatika“. Poznamenávame, že sme nezistili žiadne lokálne negatívne účinky po instilácii zmesi aminokyseliny s antiglaukomatikom do spojkového vaku králikov.

ZÁVERY

Vychádzajúc z predložených experimentálnych záznamov môžeme zhrnúť, že:

- samotná diaminodikarbonová aminokyselina L-lyzín.2HCl.2H₂O počas celých štyroch hodín neovplyvnila hladinu fyziologického VOT králikov;
- v zmesi 10%L-lyzínu.2HCl.2H₂O v 0,5% Timoptole interakciou vzniká špecifické nové „bio-antiglaukomatikum“, ktoré znižuje fyziologickú hodnotu VOT králikov;
- účinok nového „bio-antiglaukomatika“ je bifázický:
 - a) prvá fáza zníženia VOT je nesignifikantná a trvá od instilácie po 60. minútu,
 - b) druhá fáza zníženia VOT má vysoko signifikantný nemenný, priamočiary priebeh a trvá od 120. minúty do 240. minúty;
- nové „bioantiglaukomatikum“, ktoré po instilácii do spojkového vaku králikov je dobre tolerované a čiastočne (v prvej fáze pôsobenia) ovplyvní aj VOT kontrolného oka.

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

LITERATÚRA

1. **Gibson, G.G., Skett, P.:** Introduction to drug metabolism. Chapman & Hall, London-N.York, 1986, 293 s.
2. **Langová, J.:** Význam ve výživě L-lysinu v humánní medicíně. Studijní zpráva, Výzkumný ústav pro farmáciu a biochemii. Praha, 1982, 41 s.
3. **Müller, Z.:** Aminokyseliny ve výživě zvířat. SZN, Praha, 1969, 371 s.
4. **Nathanson, J.A.:** Adrenergic regulation of intraocular pressure: Identification of β_2 -adrenergic-stimulated adenylate cyclase in ciliare in ciliary process epithelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 1980: 7420–7424.
5. **Veselovský J., Oláh Z., Veselovská Z., et al.:** Mechanizmus účinku pilokarpínu v tkanivových štruktúrach predného segmentu oka z hľadiska jeho interakcie s voľnými aminokyselinami. Čs. Oftal., 54, 1998: 10–17.
6. **Veselovský J., Oláh Z., Veselovská Z., et al.:** Bioaktivita zmesi pilokarpínu s lyzínom na pupilu a vnútroočný tlak králikov. Čs. Oftal., 54, 1998: 353–361.
7. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., et al.:** Fyziologický význam interakcie Timololu s voľnými aminokyselinami v štruktúrach oka. Čes. a slov. Oftal. 58, 2002, 3: 143–148.
8. **Veselovský, J., Oláh, Z., Veselá, A., et al.:** The free amino acids and the aqueous humor pH after antiglaucomatics in vitro. Bratisl. lek. Listy 104, 2003, 1: 14–18.
9. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., et al.:** Zmes Timoptolu s L-arginínom.HCl: regulátor vnútroočného tlaku králikov. Čes. a slov. Oftal., 59, 2003: 295–302.
10. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., et al.:** Vnútroočný tlak králikov po aplikácii 10%L-arginínu.HCl v 2% Trusopte. Čes. a slov. Oftal. 60, 2004, 2: 81–88 .
11. **Veselovský J., Oláh Z., Veselá A., et al.:** Reakcia fyziologického vnútroočného tlaku králikov na lantanoprost (Xalatan) a jeho zmesi s aminokyselinou L-arginínom.HCl. Čes. a slov. Oftal. 60, 2004, 5: 319–327.

*Doc. RNDr. Ján Veselovský, DrSc.
Katedra živočišnej fyziológie a etológie PriF UK
Mlynská dolina B/2
842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Česká oftalmologická společnost
ve spolupráci s diabetologickou společností
pořádá dne 22. října 2005 symposium

DIABETES MELLITUS – OČNÍ KOMPLIKACE

Koordinátory jsou:

doc. MUDr. Jiří Řehák, CSc., přednosta Oční kliniky FN a LF UP Olomouc
a MUDr. Věra Loyková, II. interní klinika FN Olomouc.

Místo konání: Právnická fakulta UP Olomouc

Informace: www.fnol/utvary/ocni.cz