

Бенфотіамін як антиоксидант у дренажній зоні ока при поєднаному моделюванні глаукоми та діабету

І.М. Михайцева¹, В.Р. Юревич²

¹ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України», Одеса;

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького;

e-mail: iradocira@gmail.com

При моделюванні глаукоми з діабетом у кролів у фільтруючих тканинах ока формується стан окисного стресу зі значним зниженням активності антиоксидантних ферментів та накопиченням продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків. Жиророзчинна форма вітаміну В1 бенфотіамін ефективно знижував прояви окисного стресу в тканинах кута передньої камери очей тварин. Ця біологічно активна речовина підвищувала антиоксидантні можливості у тканинах, активуючи ферменти антирадикального захисту: активність супероксиддисмутази збільшилася на 51%, каталази на – 36% та глутатіонпероксидази – на 45% порівняно з групою тварин без лікування. Крім того, під впливом бенфотіаміну зменшувалися процеси перекисного окиснення ліпідів та окисного руйнування білкових молекул. Активність малонового діальдегіду знижувалася на 47%, а маркера оксидативного пошкодження білків СО-груп – на 35%. Отримані результати в експерименті на моделях захворювання можуть бути обґрунтуванням для вивчення фармагента бенфотіаміну в клініці глаукоми, яка супроводжується цукровим діабетом, що розширить арсенал патогенетично обґрунтованої терапії цього тяжкого захворювання.

Ключові слова: бенфотіамін; окисний стрес; глаукома; діабет, тканини ока.

ВСТУП

Глаукома – прогресуюче нейродегенеративне захворювання, основним фактором ризику якого вважається підвищений внутрішньоочний тиск (ВОТ). Окисний стрес, як частина нейродегенеративного процесу в уражені зорового нерва, також бере участь у пошкодженні шляхів відтоку внутрішньоочної рідини, що в свою чергу спричинює збільшення ВОТ і прогресування хвороби [1, 2]. На стан цих тканин ока впливають речовини з антиоксидантним потенціалом, серед них і деякі вітаміни. Зниження споживання тіаміну з їжею призводить до порушення енергетичного обміну та підвищеного рівня клітинного окисного стресу. Встановлено, що люди з високим рівнем споживання вітаміну В1 мали вдвічі нижчий ризик захворюваності первинною глаукомою [3]. При цукровому діабеті дефіцит тіаміну може спровокувати

різні порушення, складовою частиною патогенетичного механізму яких є також окисний стрес і зниження редокс-статусу клітин. При судинних ускладненнях цукрового діабету, включаючи діабетичну ретинопатію, широко застосовуються препарати вітаміну В1 [4].

Основна проблема для використання водорозчинної форми тіаміну в терапевтичних цілях це низька біодоступність. Він погано проникає через ліпідні шари біомембран. Альтернативою для тіаміну як джерела вітаміну В1 є його жиророзчинна форма бенфотіамін. Відкрите тіазольне кільце в хімічній структурі відрізняє його від тіаміну. Після попадання до організму бенфотіамін дефосфорилує до високофільного S-бензоїлтіаміну і легко дифундує через біологічні мембрани. В крові S-бензоїлтіамін захоплюється еритроцитами і перетворюється на активний тіамін [5].

© І.М. Михайцева, В.Р. Юревич

Виявлено, що бенфотіамін проявляє антиоксидантні властивості, пригнічує надлишкове утворення оксиду азоту (NO), перекисне окиснення ліпідів, окиснення білків і пошкодження ДНК при нефротоксичності у щурів, яка індукується цисплатином [6]. Нами було встановлено вплив бенфотіаміну на карбонільні метаболіти в тканинах ока тварин при моделюванні очної гіпертензії та діабету [7]. Він також спроможний модулювати експресію антиоксидантних ферментів, включаючи супероксиддисмутази (СОД), каталазу і глутатіонпероксидазу (ГПО), які беруть участь у антиоксидантному захисті, і демонструвати властивості скавенжера вільних радикалів [8].

Дисфункція ендотелію є ознакою таких серцево-судинних захворювань, як гіпертонія, інфаркт, інсульт, а також первинної глаукоми [9]. Окисний стрес часто призводить до дисфункції ендотелію судин, бенфотіамін зменшує його, активує ендотеліальну NO-синтазу, та, таким чином, запобігає дисфункції ендотелію [10]. У наших попередніх дослідженнях було показано, що у тварин з експериментальною глаукомою (офтальмогіпертензією) та стрептозоточинним діабетом, а особливо при сумісному їх моделюванні, виявлено високий рівень окисного стресу зі збільшенням концентрації продуктів ліпооксигенації, окиснення білків та зниженням активності ферментів антиоксидантного захисту в тканинах дренажної зони очей [11, 12]. Можливість коригування метаболічного стану тканин ока при глаукомі, яка супроводжується діабетом, в умовах розвинутого окисного стресу, є актуальною задачею. Припускаємо, що саме такою фармакологічною сполукою, здатною ефективно запобігати окисному пошкодженню тканин ока при цих офтальмологічних захворюваннях, є ліпофільний аналог тіаміну – бенфотіамін.

Мета нашої роботи – вивчення дії бенфотіаміну у дренажній зоні ока при моделюванні глаукоми, яка супроводжується діабетом.

МЕТОДИКА

Експериментальні дослідження проводили на 32 кроликах масою 3 кг відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей» (Страсбург, 1986), «Правил виконання робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених наказом МОЗ України та законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009).

Дослідних тварин розділили на групи: I – моделювання глаукоми і діабету (10 кроликів), II – моделювання глаукоми і діабету з наступним введенням бенфотіаміну (12 кроликів), III – інтактні тварини (n = 10). Діабет моделювали внутрішньовенною ін'єкцією стрептозоточину в дозі 65 мг/кг [13]. Через тиждень індукували глаукому (офтальмогіпертензію) за допомогою підвищення ВОТ введенням у передню камеру очей 0,25 мл 2%-го розчину метилцелюлози, що робили під загальною анестезією за допомогою ін'єкції кетаміну 50 мг/кг [14]. Для місцевої анестезії використовували очні краплі 0,5%-го розчину проксиметакаїну гідрохлориду (алкаїн).

Кроликам до початку експерименту та в динаміці його проведення вимірювали ВОТ під місцевою анестезією пневмотонометром TOPCON ST-80, а також визначали вміст глюкози в крові з використанням приладу ІМЕ-DC (Німеччина). Тваринам II групи після моделювання патологій вводили бенфотіамін per os 50 мг на добу (двічі в день по 25 мг) протягом 2 міс. Після цього їх умертвляли за допомогою летальної дози пентобарбітолу натрію в маргінальну вухну вену (100 мг/кг). Препарування очей та відбір тканин кута передньої камери, а саме трабекули, частини райдужної оболонки і циліарного тіла, здійснювали на льоду. В цих тканинах визначали активність антиоксидантних ферментів каталази, СОД і ГПО. Маркерами окисного пошкодження тканин ока були

вміст малонового діальдегіду (МДА) і карбонільних груп (СО-груп) білків.

Принцип методу визначення вмісту МДА полягає в тому, що при 100°C у кислому середовищі він реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм [15]. Вміст СО-груп у тканинах ока визначали за хромогенним продуктом їх взаємодії з 2,4-динітрофенілгідразином [16].

Активність СОД оцінювали за методом, суть якого полягає у визначенні ступеня гальмування цим ферментом реакції відновлення нітросинього тетразолію супероксидними радикалами. Активність ферменту виражали в умовних одиницях на 1 г тканини [17].

Метод визначення каталази оснований на здатності перекису водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм. Активність каталази виражали в мікрокаталах на 1 г тканини [18].

Активність ГПО визначали спектрофотометрично за швидкістю створення окисненого глутатіону за допомогою сполученої реакції з НАДФН-залежним ферментом глутатіонредуктаза, реєструючи зміну оптичної щільності при окисненні НАДФН. Актив-

ність ферменту виражали в мікрокаталах на 1 г тканини [17].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета SPSS 11 і Statistica 5.5, вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм t Стьюдента. Зміни вважали вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити вплив жиророзчинної форми вітаміну В1 бенфотіаміну на показники оксидативного стресу в тканинах дренажної зони очей кроликів з моделлю глаукоми на тлі стрептозотоцинового діабету. Його було виявлено як для показників ферментативного антиоксидантного захисту (табл. 1), так і для маркерів окисного пошкодження ліпідів і білкових молекул тканин (табл. 2). Через 2 міс лікування знижений рівень активності антиоксидантних ферментів в тканинах кута передньої камери ока, який ми відмітили у I групі, значно підвищувався при застосуванні бенфотіаміну (II група). Активність СОД у I групі була знижена і становила 57% від контролю, а при введенні бенфотіаміну вона істотно підвищувалась і становила 86%. Порівняно зі значеннями у I групі (без лікування) активність СОД була вищою на 51%.

Таблиця 1. Активність антиоксидантних ферментів в тканинах дренажної зони очей тварин з експериментальною глаукомою на тлі стрептозотоцинового діабету

Групи тварин	Супероксиддисмутаза, ум.од./г	Каталаза, мккат/г	Глутатіонпероксидаза, мккат/г
Інтактні тварини (n = 10)	24,08 ± 1,62	28,14 ± 1,60	338,60 ± 20,40
Дослідні тварини без лікування (n = 10)	13,70 ± 0,72 P < 0,001	19,01 ± 1,24 P < 0,001	208,60 ± 12,54 P < 0,001
Дослідні тварини з лікуванням бенфотіаміном (n = 12)	20,7 ± 1,05 P > 0,05 P ₁ < 0,001	25,85 ± 1,21 P > 0,05 P ₁ < 0,01	302,20 ± 19,50 P > 0,05 P ₁ < 0,01

Примітки: тут і в табл. 2: P – рівень достовірності порівняно з контролем; P₁ – рівень достовірності порівняно з групою без лікування

Активність каталази у тварин I групи була знижена і становила 68% від контролю, тоді як у II групі вона становила 92%, а відносно значень I групи була вищою на 36%. Подібна картина спостерігалася щодо ферменту ГПО. Відносно контролю його активність в I групі становила 62%, в II групі (з лікуванням) – 89%. Виявлено підвищення активності цього ферменту на 45% у кроликів II групи щодо значень у тварин I групи без лікування.

Як видно з результатів табл. 2 вміст МДА у кроликів з глаукомою і діабетом значно перевищував (на 115%) контрольні значення здорових тварин. У разі введення бенфотіаміну він знизився на 47% відносно нелікованих тварин, залишаючись вище від контрольних значень на 13%. Подібними були зміни щодо карбоксильних груп білків тканин дренажної зони очей кролів у різних експериментальних умовах. Так, вміст СО-груп у тварин з глаукомою і діабетом, яких лікували бенфотіаміном, був нижчим, ніж без лікування на 35%, залишаючись вищим від контролю на 15%.

Виявлена в експерименті при розвитку глаукоми, яка супроводжується діабетом, зміна редокс-стану в тканинах ока, що характеризується зниженням активності основних антиоксидантних ферментів, а також паралельним накопиченням у цих тканинах продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів і білків (МДА і СО-груп) визначається як патологічний механізм пошкодження – окисний стрес [19].

Прийнято вважати, що ранніми біохімічними маркерами патології, асоційованої з вільнорадикальними процесами і розвитком окисного стресу, є продукти перекисного окиснення ліпідів, зокрема МДА, а також карбоксильні СО-групи при окисній модифікації білків. Зокрема, рівень окисної модифікації білків, який ми визначали за вмістом в тканинах СО-груп, вважають одним з ранніх ознак вільнорадикального ураження в тканинах [20, 21].

Результати проведеного експериментального дослідження продемонстрували, що бенфотіамін ефективно знижував прояви окисного стресу в тканинах кута передньої камери очей тварин, яким моделювали очну гіпертензію на тлі діабету. Ця біологічно активна речовина підвищувала антиоксидантні можливості у тканинах, які вивчаються, активуючи ферменти антирадикального захисту – СОД, каталазу та ГПО. Крім того, під впливом бенфотіаміну зменшувалися процеси перекисного окиснення ліпідів та окисного руйнування білкових молекул. Наші експериментальні результати на моделях захворювання підтверджують клінічні спостереження щодо більш низького ступеня ураженості первинною глаукомою людей, які споживають більше вітаміну В1 [3]. Більш того, наші дослідження розкривають регулюючий механізм цього явища при сукупності таких тяжких патологій, як первинна глаукома та цукровий діабет. У працях багатьох авторів підкреслюється значний потенціал бенфотіаміну в профілактиці та лікуванні

Таблиця 2. Вміст продуктів (нмоль/г тканини) вільнорадикального окиснення ліпідів і білків у тканинах дренажної зони очей тварин з експериментальною глаукомою на тлі стрептозотоцинового діабету

Групи тварин	Малоновий діальдегід	СО-групи
Інтактні тварини (n = 10)	452,5 ± 38,2	5,34 ± 0,30
Дослідні тварини без лікування (n = 10)	966,6 ± 68,2 P < 0,001	9,41 ± 0,60 P < 0,001
Дослідні тварини з лікуванням бенфотіаміном (n = 12)	512,3 ± 48,4 P > 0,05 P1 < 0,001	6,12 ± 0,45 P > 0,05 P1 < 0,01

діабетичних ускладнень, пов'язаних з утворенням активних форм кисню [22, 23].

Отримані результати свідчать про здатність жиророзчинної форми вітаміну В1 стабілізувати антиоксидантний стан у тканинах дренажної зони очей тварин. Вони демонструють протекторну дію бенфотіаміну на тканини ока, знижуючи в них вираженість окисного стресу, який розвинувся при моделюванні глаукоми і діабету. Вільнорадикальне пошкодження молекул ліпідів і білків клітин дренажної зони ока знижувалося під впливом препарату. Результати в експерименті на моделях захворювання можуть бути обґрунтованими для вивчення фармагента бенфотіаміну в клініці глаукоми, яка супроводжується цукровим діабетом, що розширюють арсенал патогенетично обґрунтованої терапії цього тяжкого захворювання.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

I.N. Mikheyteva¹, V.R. Yurevich²

BENFOTHIAMINE AS AN ANTIOXIDANT IN THE DRAINAGE ZONE OF THE EYE IN COMBINED MODELING GLAUCOMA AND DIABETES

¹Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of NAMS of Ukraine, Odesa; ²Danylo Halytsky Lviv National Medical University; e-mail: iradocira@gmail.com

During experimental glaucoma with diabetes in rabbits, in the filtering tissues of the eye, a state of oxidative stress is formed manifested by a significant decrease in the activity of antioxidant enzymes and the accumulation of products of free radical oxidation of lipids and proteins. Administration of a lipid-soluble form of vitamin B1 benfotiamine effectively reduced the manifestations of oxidative stress in the tissues of the anterior chamber of the animal eyes. This biologically active substance increased antioxidant capacity in tissues by activating antiradical protection enzymes: superoxide dismutase activity increased by 51%, catalase by 36% and glutathione peroxidase by 45% compared to the untreated

animals. In addition, the processes of lipid peroxidation and oxidative destruction of protein molecules were decreased under the influence of benfotiamine. The level of malondialdehyde (MDA) was reduced by 47%, and the marker of oxidative damage to proteins of CO-groups by 35% relative to the untreated group. The results obtained may be a basis for further studies of the pharmacological substance benfotiamine in the clinic of glaucoma accompanied by diabetes, which will expand the arsenal of pathogenetically sound therapy of this serious disease.

Key words: benfotiamine; oxidative stress; glaucoma; diabetes; eye tissue.

REFERENCES

1. Izzotti A, Bagnis A, Sacca SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res.* 2006;612(2):105-14.
2. Zanon-Moreno V, Marco-Ventura P, Lleo-Perez A, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma.* 2008;17(4):263-8.
3. Ramdas WD, Wolfs RCW, Kieffe-de Jong JC, et al. Nutrient intake and risk of open-angle glaucoma: the Rotterdam study. *Eur J Epidemiol.* 2012;27:385-93.
4. Thornalley P. The potential role of thiamine (vitamin B1) in diabetic complications. *Current Diabet Rev.* 2005;1(3):287-98.
5. Gleiter GH, Schreeb KH, Freudenthaler S. Comparative bioavailability of two vitamin B1 preparations: benfotiamine and thiamin mononitrate. In: Gries FA, Federlin K, eds. *Benfotiamine in the therapy of polyneuropathy.* New York: Georg Thieme Verlag. 1998;29-33.
6. Harisa GI. Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2013;27:398-405.
7. Mikheyteva IN, Yurevich VR. The effect of the fat-soluble form of vitamin B1 on the carbonil metabolites content in the eye tissues of rabbits with experimental glaucoma, aggravated by diabetes. *Physiol J.* 2020;66(2-3):44-50.
8. Bozic I, Savic D, Stevanovic I, Pekovic S, Nedeljkovic N, Lavrnja I. Benfotiamine upregulates antioxidative system in activated BV-2 microglia cells. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:351.
9. Mikheyteva IN. Patogeneticheskoe znachenie endotel'noj disfunkcii pri pervichnoj glaukome. *Achiev Biol Med.* 2009;14(2):17-20.
10. Balakumar P, Sharma R, Singh M. Benfotiamine attenuates nicotine and uric acid-induced vascular endothelial dysfunction in the rat. *Pharmacol Res* 2008;58:356-63.
11. Yurevich VR. Aktivnost' antioksidantnyh fermentov v tkanyah ugla perednej kamery i kamernoj vlage pri eksperimental'noj gipertenzii i streptozotocinovom diabete. *Harkivs'ka Hirurgichna Shkola.* 2015, 6(75): 64-70.
12. Yurevich VR. Vliyanie oftal'mogipertenzii na uroven' produktov perekisnogo okisleniya lipidov v tkanyah

- perednego otdela glaza pri eksperimental'nom diabete. Oftal'mol Zh. 2015;4(38-43).
13. Wang J, Wan R, Mo Y. Creating a long-term diabetic rabbit model. Exp Diabetes Res. 2010;6:1-10.
 14. Zhu M, Cai F. Development of experimental chronic intraocular hypertension in the rabbit. Australian and New Zeland J Ophthalmol. 1992;20:225-34.
 15. Orekhovich VN. Sovremennye metody v biohimii. M.: Medicina. 1977.
 16. Fields R, Dixon H. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine. Biochem J. 1971;121:587-9.
 17. Novy'e metody biokhimicheskogo analiza. Leningrad Univ. 1991.
 18. Bergmeyer HU. Methoden der enzymatischen analyse. Herausgegeben von HU Bergmeyer, Berlin. 1986.
 19. Voronych-Semchenko NM, Guranych TV. Changes of processes of free radical oxidation of lipids and proteins, antioxidant defense in rats with hypofunction of thyroid gland on the background of iodine and copper deficit. Physiol J. 2014;60(4):30-9.
 20. Davanand C, Vegi P. Protein carbonyl content as a stable oxidative stress marker in type II diabetes. Int J Biol Med Res. 2012;3:2362-65.
 21. Davy'dov V, Bozhkov A. Karbonil'ny'j stress kak nespecificheskij faktor patogeneza. Zh NAMN Ukr, 2014;20(1):25-34.
 22. Schmid, U., H. Stopper, A. Heidland and N. Schupp,. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. Diabetes Metab Res Rev. 2008;24:371-7.
 23. Bushra Hasan Marouf, Tavga Ahmed Aziz, Munaf Hashim Zalzala, Saad Abdulrahman Hussain. Free radical scavenging activity of benfotiamine in nitrite-induced hemoglobin oxidation and membrane fragility models. J Pharm Biomed Sci. 2010;1(1):13-8.

*Матеріал надійшов
до редакції 08.12.2021*