

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2019-23(2)-06

УДК: 616.379 - 008.64 - 06-02:577.152.12

## РОЛЬ НІКОТИНАМІДУ В КОРЕКЦІЇ ФУНКЦІЙ НИРОК ЗА ДІАБЕТИЧНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Яніцька Л.В., Осінська Л.Ф., Редько А.В.

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця (проспект Перемоги, 34, м. Київ, Україна, 03057)

Відповідальний за листування:  
e-mail: yanitskayalesya@gmail.com

Статтю отримано 1 квітня 2019 р.; прийнято до друку 3 травня 2019 р.

**Анотація.** Гіперглікемія цукрового діабету (ЦД) призводить до активації поліолового шляху окислення глюкози з активацією ферментів альдозоредуктази та сорбітолдегідрогенази та їх коферментів NADPH і NAD<sup>+</sup>, що запускає механізм утворення сорбітолу. Наслідки цих змін призводять до мікроангіопатії тканин нирок, що може бути одним із патогенетичних механізмів діабетичної нефропатії [5]. У доступній літературі недостатньо визначена роль коферментів сорбітолового шляху в розвитку діабетичної нефропатії. Мета дослідження - вивчити вміст коферментів NAD та NADPH та їх співвідношення, а також їх роль у механізмі порушення функцій нирок при цукровому діабеті та можливої корекції змін за участі нікотинаміду. Дослідження проведено на моделі стрептозотоцинового цукрового діабету (одноразове введення стрептозоточину у дозі 60 мг на 1 кг маси тіла). Через чотири тижні індукції діабету вводили нікотинамід (100 мг на 1 кг маси тіла). Рівень глюкози визначали глюкометром "Ассі-чек" (Roshediagnosics, Швейцарія). Визначали вміст NAD і NADH в безбілковому екстракті. Статистичний аналіз проводиться за програмою статистичного аналізу Microsoft Excel. Різницю між показниками вважали статистично значущою ( $p < 0,05$ ). Встановлено зниження рівня NAD на 31%, співвідношення NAD/NADH на 32%. Визначено залежність співвідношення NADP/NADPH в умовах гіперглікемії цукрового діабету з клінічними проявами діабетичної нефропатії. Виявлено зниження співвідношення NADP/NADPH на 38% у кірковому шарі нирок щурів. Введення нікотинаміду нормалізувало знижений вміст NAD у діабетичних щурів. Ці результати дають перспективу для подальшого дослідження, в яких нікотинамід може бути використаний в якості ниркового протектора.

**Ключові слова:** нефропатія, стрептозотоциновий цукровий діабет, NAD, NADPH, NADP/NADPH, альдозоредуктаза, сорбітолдегідрогеназа, нікотинамід.

### Вступ

Цукровий діабет - це хронічна, прогресивна і найпоширеніша метаболічна хвороба, яка стала епідемією 21-го століття. Діабетична нефропатія є одним з тяжких ускладнень цукрового діабету. Захворювання розвивається на тлі гіперглікемії, що призводить до пошкодження ниркових клубочків на клітинному рівні. Це викликає порушення функції нирок. Збільшення концентрації внутрішньоклітинних активних форм кисню (АФК) і активних форм нітрогену (АФН) при цукровому діабеті призводить до активації окислювального стресу [10]. Окислювальний стрес є одним з головних механізмів розвитку пошкоджень функцій нирок при діабетичній нефропатії з активацією поліолового шляху, який пов'язаний з накопиченням сорбітолу [5].

Активация поліолового шляху призводить до активації альдозоредуктази і збільшення концентрації NADPH, що запускає механізм конверсії в сорбітол. Збільшення активності альдозоредуктази при гіперглікемії передбачає виснаження NADPH, що зменшує пул антиоксидантів, зокрема внутрішньоклітинного глутатіону. Сорбітолдегідрогеназа - другий ензим поліолового шляху обміну глюкози, коферментом якого є NAD, який метаболізує сорбітол у фруктозу.

Наслідки цих змін призводять до мікроангіопатії тканин нирок з розвитком судинних змін, що може бути одним із патогенетичних механізмів діабетичної нефропатії [4].

Патофізіологічні механізми діабетичної нефропатії

є не цілком зрозумілі. У доступній літературі недостатньо визначено роль коферментів сорбітолового шляху в розвитку діабетичної нефропатії. Тому актуальним є визначення ролі коферментів NAD і NADPH, їх співвідношення в результаті порушення функцій нирок за цукрового діабету та можливої корекції цих змін за участі нікотинаміду.

Нікотинамід (вітамін В3) - ендogenous метаболіт, біохімічний попередник нікотинамідаденіндинуклеотиду. Нікотинамід поліпшує енергетичний стан в ішемізованих тканинах, покращує метаболічні діабетичні зміни, протидіючи дисфункції бета-клітин і втрат, пов'язаних з окислювальним стресом [2]. Встановлено, що NAD відіграє важливу роль у клітинному диханні, репарації дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК), ацетилюванні протеїнів тощо. Нікотинамід інгібує окисне пошкодження мембран АФК [2, 8]. Авторами показано, що нікотинамід захищає від окислення білки і перекисного окислення ліпідів. Інгібування було більш вираженим щодо окислення білків, ніж перекисного окислення ліпідів. Інгібуючі властивості нікотинаміду були більші, ніж у ендogenous антиоксидантів - аскорбінової кислоти і альфа-токоферолу [3]. Отже, дослідження показують, що нікотинамід можна розглядати як потужний антиоксидант, здатний захистити клітинні мембрани від окисного ушкодження, викликаного АФК, що забезпечує захист від вільних радикалів і окисного стресу, тому метою роботи стало дослідити вміст NAD у кірковому шарі нирок,

співвідношення NAD/NADH, NADP/NADPH, а також визначити залежність співвідношення NADP/NADPH за діабетичної нефропатії та можливої корекції цих змін за участі нікотинаміду.

### Матеріали та методи

Дослідження проведено, на моделі шеститижневого стрептозотоцинового цукрового діабету у щурів-самців лінії Wistar масою 180-210 г шляхом внутрішньочеревного одноразового введення стрептозотину у дозі 60 мг на 1 кг маси тіла.

Дослідження було проведено із дотриманням правил Європейської конвенції щодо захисту тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.). Тварини були поділені на 3 групи - контрольна група щурів, група діабетичних щурів та група діабетичних щурів, яким через чотири тижні індукції діабету вводили внутрішньочеревинно нікотинамід у дозі 100 мг на 1 кг маси тіла. Рівень глюкози визначали глюкометром "Accu-check" (Roshediagnosics, Швейцарія). Під загальною анестезією, тварин було декапітовано натщесерце, кірковий шар нирок був ізольований та розтертий у рідкому нітрогені до порошку NADH [5]. Статистичний аналіз проводився за допомогою програми статистичного аналізу Microsoft Excel за допомогою критеріїв t при рівнях значущості  $p < 0,05$ .

### Результати. Обговорення

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що рівень глікемії у щурів за експериментального цукрового діабету становив на 1-5 дні експерименту - 4,9 ммоль/л, а через 4 тижні - 17,8 ммоль/л у порівнянні з контрольною групою, тобто збільшився у 3,5 рази (табл. 1).

Досліджено, що у кірковому шарі нирок діабетичних щурів вміст NAD знизився на 31%, при цьому співвідношення NAD/NADH та NADP/NADPH також знизилися у порівнянні з контрольною групою на 32% та 38% відповідно (табл. 2).

Зниження концентрації NAD сприяє гальмуванню перетворення сорбітолу у фруктозу, тобто може накопичуватися сорбітол у кірковому шарі нирок, що призводить до активації гіпоксії, вільнорадикальних процесів, порушенню антиоксидантної системи захисту [7]. Оскільки NAD є головним акцептором електронів у реакції окислення глюкози, то зниження співвідношення NAD/NADH може свідчити про те, що NADH виступає в ролі конкурентного інгібітора у метаболічних шляхах за участі NAD. Як видно з таблиці 2, при діабетичній нефропатії в кірковому шарі нирок щурів виявлено зниження співвідношення NADP/NADPH на 38%, яке частково нормалізується за введення нікотинаміду. Це зниження може бути результатом активації поліолового шляху обміну глюкози, оскільки підвищується спорідненість ключового ензиму цього шляху альдозоредуктази до внутрішньоклітинної глюкози [5]. Це також свідчить про

**Таблиця 1.** Концентрація глюкози в крові досліджуваних щурів, ммоль/л ( $M \pm m$ ,  $n=15$ ).

Група	
Контрольна	З цукровим діабетом
4,9 $\pm$ 0,4	17,8 $\pm$ 1,5*

**Примітка.** \* - різниця достовірна у порівнянні з показниками контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

**Таблиця 2.** Вміст NAD, NAD/NADH і NADP/NADPH у корковому шарі нирок щурів за діабетичної нефропатії (мкмоль/г,  $M \pm m$ ).

Показник	Група		
	Контрольна	З цукровим діабетом	З цукровим діабетом + нікотинамід
NAD	0,261 $\pm$ 0,023	0,180 $\pm$ 0,012*	0,204 $\pm$ 0,015#
NAD/NADH	297,0 $\pm$ 21,2	202,0 $\pm$ 16,1*	269,0 $\pm$ 17,1#
NADP/NADPH	0,013 $\pm$ 0,002	0,008 $\pm$ 0,001*	0,011 $\pm$ 0,001#

**Примітки:** \* - різниця достовірна у порівнянні з показниками контрольної групи ( $p < 0,05$ ), # - різниця достовірна у порівнянні з показниками діабетичної групи ( $p < 0,05$ ).

здатність альдозоредуктази ініціювати глікооксидативні та ліпооксидативні порушення, які пошкоджують мікросудини клубочків і канальців нирок [6].

Зниження NADPH, необхідного також для відновлення окисного глутатіону (GSSG) до відновленого (GSH), може викликати зниження GSH що сприяє накопиченню АФК і посиленню окислювального стресу [10]. Таким чином, зниження рівня NADPH є важливим при знешкодженні АФК. Доведено, що АФК беруть участь у регуляції судинного тонуусу шляхом синтезу NO-синтази, яка сприяє вазодилататорному ефекту. Виснаження NADPH сприяє розвитку гіпоксії та нирковому ремоделюванню при діабеті, через зменшення рівня NO-синтази, який покращує кровообіг [6, 9].

Даний механізм опосередковано впливає на підвищення рівня простагландинів і знижує скоротливість мезангіальних клітин, викликаючи гіперфільтрацію і клубочкову дисфункцію у хворих на цукровий діабет. В умовах виснаження NADPH достатня кількість NO-синтази не утворюється, що призводить до зменшення кровотоку та розвитку гіпоксії. За патологічних захворювань нирок, зокрема цукрового діабету, АФК також беруть участь у розвитку запальних процесів, ендотеліальних дисфункцій, проліферації клітин, фіброзу, ангиогенезу, артеріальної гіпертензії, атеросклерозу тощо.

Надлишкове утворення АФК активує протеїнкіназу С, систему ренін-ангіотензину, цитокини та фактори транскрипції, що може призвести до підвищеної експресії генів позаклітинного матриксу з прогресією розвитку фіброзу і ниркової недостатності [10]. Не виключено, що на тлі гіперглікемії однією із можливих причин змін співвідношення вільних NAD/NADH, що супроводжується розвитком діабетичних ускладнень, може бути мутація в гені мітохондріальної ND1. Цей механізм було продемонстровано у дослідженнях авторів, які показали,

що точкова мутація в гені мітохондріальної ND1 (NADH-дегідрогенази) призводить до порушення регуляції шляхом змін співвідношення вільних NAD/NADH у хворих на цукровий діабет пацієнтів, оскільки мітохондріальна NADH-дегідрогеназа є одним із основних чинників окислення NAD [4]. Підвищене окислення внутрішньоклітинних жирних кислот, яке має місце в умовах гіперглікемії, призводить до зростання мітохондріального співвідношення NADH/NAD, активації утворення активних форм кисню (АФК) та активації протеїнази С, AGE і NF-κB [1]. Крім того, збільшення внутрішньоклітинного співвідношення вільних NADH/NAD призводить до гальмування гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, що в свою чергу, підвищує концентрацію внутрішньоклітинного гліцеральдегід-3-фосфату. За високої його концентрації утворюється метилгліоксаль, попередник діацилгліцеролу (DAG) і кінцевих продуктів глікозилювання (AGE), що призводить до активації AGE та протеїнази С [1].

Було виявлено, що введення нікотинаміду призводило до збільшення вмісту NAD у кірковому шарі нирок діабетичних щурів, який був знижений за діабетичної нефропатії (табл. 2).

Позитивний ефект нікотинаміду був показаний авторами, які спостерігали пригнічення біосинтезу і активації окислення сорбіту при його введенні діабетичним щурам [7]. Ефект нікотинаміду, пов'язаний зі зниженням вмісту сорбітолу в тканинах, автори відзначали в гострому і хронічному експерименті. Дія нікотинаміду на обмін сорбітолу при діабеті опосередковується через гіпоглікемічний ефект препарату, що супроводжується зниженням вмісту глюкози в тканинах. Доведено, що гіпоглікемічна дія нікотинаміду пов'язана з пригніченням

ням ключових реакцій глюконеогенезу в печінці [2].

Таким чином, застосування вітаміну В3 (нікотинамід), який володіє широким спектром дії буде також призводити до пригнічення процесів перекисного окислення ліпідів шляхом зниження утворення вільних радикалів. Це є важливим у контексті того, що знижується утворення 4-гідроксисиноналу, який є одним із основних токсичних альдегідів пероксидації ліпідів та проявляє цитотоксичну дію на клітини проксимальних канальців [1]. Виснаження пулу нікотинамідних динуклеотидів за діабету також може призводити до розвитку гіпоксії та дисфункцій нирок, не виключено, що і за рахунок зниження рівня NO-синтази.

### Висновки та перспективи подальших розробок

1. В умовах експериментального цукрового діабету встановлено зниження рівня NAD на 31%, співвідношення NAD/NADH на 32%. Визначено залежність співвідношення NADP/NADPH в умовах гіперглікемії цукрового діабету з клінічними проявами діабетичної нефропатії. Виявлено зниження співвідношення NADP/NADPH на 38% в кірковому шарі нирок щурів, що свідчить про здатність альдозоредуктази ініціювати глікооксидативні та ліпооксидативні порушення, які пошкоджують мікросудини клубочків і канальців нирок.

2. Позитивний гіпоглікемічний ефект нікотинаміду, збільшення зниженого вмісту NAD у нирках діабетичних щурів, сприяє пригніченню біосинтезу сорбітолу.

Отримані результати дають перспективу для подальшого дослідження, в яких нікотинамід може бути використаний в якості ниркового протектора.

### Список посилань

1. Иванов, В. В., Шахристов, Е. В., Степовая, Е. А., Жаворонков, Т. В., & Новицкий, В. В. (2010). Перекисное окисление липидов и система глутатиона в жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом. *Бюллетень СО РАМН*, 30 (6), 101-104.
2. Faris Q. Alenzi. (2009). Effect of Nicotinamide on Experimental Induced Diabetes. *Iran J. Allergy Asthma Immunol*, 8 (1), 11-18. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/0e05/7b48f3e5e4e817ace22d816ac0dbd245e437.pdf>.
3. Golbidi, S., Ebadi, S. A., & Laher, I. (2011). Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr. Diabetes Rev.*, 7 (2), 106-125, <https://doi.org/10.2174/157339911794940729>.
4. Hashimoto, Y., Ya magishi, S., Mizukami, H. Chihiro Yabe-Nishimura, Sun Woo Lim, H Moo Kwon, & Soroku Yagihashi. (2011). Polyol pathway and diabetic nephropathy revisited: Early tubular cell changes and glomeropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase. *J. Diabetes Investig.*, 2 (2) 111-122. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00071.x>.
5. Liang jun Yan. (2018). Redox imbalance model *Exp. Med.*, 1 (1), 7-13. <https://doi.org/10.1002/ame2.12001>.
6. Popov, D. (2010). Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2 (3), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijdm.2010.09.002>.
7. Reidy, K., Kang, H. M., & Hostetter, T. K. (2014). Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J. Clin. Invest.*, 124 (b), 2333-2340, <https://doi.org/10.1172/jci72271>.
8. Tang, S. C., Chan, G. C., & Lai, K. N. (2016). Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy. *F1000Research*, 31 (5), 7693, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7693.1>.
9. Yaeni Kim, Cheol Whee Park. (2017). New therapeutic agents in diabetic nephropathy. *Korean J. Intern. Med.*, 32 (1), 11-25, <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.174>.
10. Yang H. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49 (11), 1773-1782. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.250>.

### References

1. Ivanov, V. V., Shahriстов, E. V., Stepovaya, E. A., Zhavoronok, T. V., & Novickij, V. V. (2010). Perekisnoe okislenie lipidov i sistema glutatiона v zhirovoj tkani kryс s alloxanovym diabetom [Lipid peroxidation and the glutathione system in the adipose tissue of rats with alloxan diabetes]. *Byulleten SO RAMN - Bulletin SB RAMS*, 30 (6), 101-104.
2. Faris Q. Alenzi. (2009). Effect of Nicotinamide on Experimental Induced Diabetes. *Iran J. Allergy Asthma Immunol*, 8 (1), 11-18. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/0e05/7b48f3e5e4e817ace22d816ac0dbd245e437.pdf>.
3. Golbidi, S., Ebadi, S. A., & Laher, I. (2011). Antioxidants in the

- treatment of diabetes. *Curr. Diabetes Rev.*, 7 (2), 106-125, <https://doi.org/10.2174/157339911794940729>.
4. Hashimoto, Y., Yamagishi, S., Mizukami, H., Chihiro Yabe-Nishimura, Sun Woo Lim, H Moo Kwon, & Soroku Yagihashi. (2011). Polyol pathway and diabetic nephropathy revisited: Early tubular cell changes and glomeropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase. *J. Diabetes Investig.*, 2 (2) 111-122. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00071.x>.
  5. Liang jun Yan. (2018). Redox imbalance model *Exp. Med.*, 1 (1), 7-13. <https://doi.org/10.1002/ame2.12001>.
  6. Popov, D. (2010). Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2 (3), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijdm.2010.09.002>.
  7. Reidy, K., Kang, H. M., & Hostetter, T. K. (2014). Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J. Clin. Invest.*, 124 (b), 2333-2340, <https://doi.org/10.1172/jci72271>.
  8. Tang, S. C., Chan, G. C., & Lai, K. N. (2016). Recent advances in managing and understanding diabetic nephropathy. *F1000Research*, 31 (5), 7693, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7693.1>.
  9. Yaeni Kim, Cheol Whee Park. (2017). New therapeutic agents in diabetic nephropathy. *Korean J. Intern. Med.*, 32 (1), 11-25, <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.174>.
  10. Yang H. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49 (11), 1773-1782. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.250>.

#### РОЛЬ НИКОТИНАМИДА В КОРРЕКЦИИ ФУНКЦИЙ ПОЧЕК ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

Яницкая Л.В., Осинская Л.Ф., Редько А.В.

**Аннотация.** Гипергликемия сахарного диабета (СД) приводит к активации полиолового пути окисления глюкозы с активацией ферментов альдозоредуктазы и сорбитолдегидрогеназы и их коферментов NADPH и NAD + запускающий механизм образования этого вещества. Последствия этих изменений приводят к микроангиопатии тканей почек, что может быть одним из патогенетических механизмов диабетической нефропатии. В доступной литературе недостаточно определена роль коферментов сорбитолового пути в развитии диабетической нефропатии. Цель исследования - изучить содержание коферментов NAD и NADPH и их соотношение, а также их роль в механизме нарушения функции почек при сахарном диабете и возможной коррекции изменений с участием никотинамида. Исследование проведено на модели стрептозотоцинового сахарного диабета (однократное введение стрептозотоцина в дозе 60 мг на 1 кг массы тела). Через четыре недели индукции диабета вводили никотинамид (100 мг на 1 кг массы тела). Уровень глюкозы определяли глюкометром "Ассу-чек\_" (Roshediagnosics, Швейцария). Определяли содержание NAD и NADH в безбелковом экстракте. Статистический анализ проводился по программе статистического анализа Microsoft Excel. Разницу между показателями считали статистически значимой ( $p < 0,05$ ). Установлено снижение уровня NAD на 31%, соотношение NAD / NADH на 32%. Определена зависимость соотношения NADP / NADPH в условиях гипергликемии сахарного диабета с клиническими проявлениями диабетической нефропатии. Выявлено снижение соотношения NADP / NADPH на 38% в корковом слое почек крыс. Введение никотинамида нормализовало пониженное содержание NAD у диабетических крыс. Эти результаты дают перспективу для дальнейшего исследования, в которых никотинамид может быть использован в качестве почечного протектора.

**Ключевые слова:** нефропатия, стрептозотоциновый сахарный диабет, NAD, NADPH, NADP/NADPH, альдозоредуктаза, сорбитолдегидрогеназа, никотинамид.

#### THE ROLE OF NICOTINAMIDE IN THE CORRECTION OF RENAL FUNCTION IN DIABETIC NEPHROPATHY

Yanitskaya L.V., Osinskaya L.F., Redko A.V.

**Annotation.** Hyperglycemia of diabetes mellitus leads to the activation of the polyol way of oxidation of glucose with the activation of the enzymes of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase and of their coenzymes NADPH and NAD, which triggers the mechanism of formation of sorbitol. The consequences of these changes lead to microangiopathy of the tissues of the kidneys, which may be one of the pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. In an accessible literature, the role of coenzymes of sorbitol pathway in the development of diabetic nephropathy is not sufficiently defined. The purpose of the study was to study the content of NAD and NADPH coenzymes, their correlation, and their role in the mechanism of kidney damage in diabetes mellitus and to predict the possible correction of these changes with the NAD-nicotinamide derivative. The study was conducted on a model of streptozotocin diabetes mellitus (single administration of streptozotocin in a dose of 60 mg per 1 kg of body weight). Four weeks after induction of diabetes, nicotinamide (100 mg per 1 kg body weight) was injected. The level of glucose was determined by the Accu-check (Roshe Diagnostics, Switzerland) glucose meter. The content of NAD and NADH was determined in the non-protein extracts. The statistical analysis was carried out using the Microsoft Excel statistical analysis program. The difference between the indicators was considered statistically significant ( $p < 0.05$ ). The NAD level was reduced by 31%, the NAD/NADN ratio was 32%. The dependence of the ratio of NADP/NADPN in conditions of hyperglycemia of diabetes mellitus with clinical manifestations of diabetic nephropathy is determined. A decrease in the ratio of NADP/NADPN to 38% in the rat kidney in the cortical layer was detected. The introduction of nicotinamide normalized the reduced content of NAD diabetic rats. These results provide perspectives for further research in which nicotinamide can be used as a renal protector.

**Keywords:** nephropathy, streptozotocin diabetes, NAD, NADPH, NAD(P)/NAD(P)H, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase, nicotinamide.