

ВЛИЯНИЕ НИКОТИНАМИД СОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С НЕПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ахмад Абед Аль Рахим АбдаллахАкрабави, В.Н.Сакович.

ГУ"Днепропетровская медицинская академия" МЗ Украины"

Ключевые слова: непролиферативная диабетическая ретинопатия, эксперимент, лечение, никотинамидные коферменты

Введение. Одним из наиболее тяжелых осложнений сахарного диабета является диабетическая ретинопатия, поражающая нервные элементы и сосуды сетчатой оболочки органа зрения, наблюдаемая у 10% пациентов при сахарном диабете [11].

В настоящий момент существующие методы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии являются не достаточно эффективными. Поэтому необходим поиск новых, усовершенствованных способов лечения [5,23].

Патогенез диабетической ретинопатии сложный, многофакторный и окончательно не изучен.

Можно отметить, что в последние годы в качестве пусковых метаболических нарушений, приводящих к поражению сосудистой, нервной и других тканей организма, рассматривается в первую очередь не столько повышенный уровень глюкозы в крови, а в первую очередь возрастание концентрации целого ряда высокореактивных метаболитов углеводно-фосфорного и липидного обменов, таких как, метилглиоксаль, ацетоацетат, диацилглицерин, дезоксиглюкоза и другие. Повышение концентрации этих соединений не только отрицательно отражается на состоянии обмена веществ, но и непосредственно вызывает нарушения регуляции обмена и функции клеток тканей организма [1,13,15,18].

Особое значение в плане пусковых механизмов поражения нейроэпителлия и сосудистого эндотелия придается состоянию оксидативного стресса, обусловленного, в первую очередь, возросшим уровнем свободно-радикальных форм кислорода. Повышенная генерация этих соединений, как правило, обусловлена, прежде всего, нарушениями функций митохондрий - энергетических станций клетки. В этой связи состояние митохондрий в сетчатке при диабете заслуживает особого внимания. И действительно, в исследованиях последних лет активно изучается роль этих ультраструктур в повышенной генерации активных форм кислорода в сетчатке при диабете [9,14,15,16].

В ряде экспериментальных исследований, при развитии экспериментального диабета в различных тканях орга-

низма выявлено нарушение обмена и функции никотинамидных коферментов нуклеотидов.

Необходимо также отметить, очень важное место в регуляции тканевого метаболизма занимают никотинамидные нуклеотиды: изменение уровня их окисленных (НАД - никотинамидадениндинуклеотид и НАДФ - никотинамидаденинди-нуклеотид фосфат) или восстановленных форм (НАД-Н и НАДФ-Н) могут ускорять или замедлять протекание окислительно-восстановительных реакций. Соотношение свободных форм окисленного и восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) оказывает выраженное воздействие на направленность и интенсивность целого ряда важнейших катаболических и анаболических процессов в организме [2,6,7,8,12,20].

При исследовании широкого спектра метаболических эффектов витамина РР при диабете был выявлен ряд благоприятных моментов. Так, введение никотиновой кислоты и никотинамида приводит к снижению уровня глюкозы в крови животных с аллоксановым диабетом и больных сахарным диабетом, а также оказывает выраженный ингибирующий эффект на процессы липолиза и кетогенеза. Введение витамина РР животным с аллоксановым диабетом сопровождается активацией окисления глюкозы по гликолитическому пути и ингибированием глюконеогенеза в печени, усиление которого является одним из факторов прогрессирования диабетической гипергликемии [17,19,21].

Имеются экспериментальные данные, что введение никотинамида защищает животных от диабетического действия стрептозотоцина и аллоксана, что объясняется сильным ингибирующим действием никотинамида на поли - ЛБР-рибозосинтетазу бета-клеток, активность которой повышена при экспериментальном диабете, что сопровождается уменьшением содержания НАД [17,22].

Сделано предположение об обратимости развития поражений бета-клеток на ранних этапах инсулин-зависимого диабета и о возможности применения никотинамида для их коррекции.

Цель работы: изучить влияние никотинамид содержащих препаратов (катахром и цитофлавин) на концентрацию никотинамидных коферментов в крови больных с непролиферативной диабетической ретинопатией и в эксперименте.

Материал и методы исследования. Исследования были проведены на 107 пациентах. Из них 52 пациентов - группа сравнения, больные с диабетической ретинопатией, которые получали традиционную терапию, 55 пациента - основная группа, больные с диабетической ретинопатией и сочетанным применением цитофлавина и катахрома.

Для сравнения результатов наблюдения, исследования также проводились на 37 крысах линии Вистар весом 180–200 г. При проведении эксперимента были соблюдены рекомендации относительно исследований на животных, принятые международным сообществом при изучении зрения и офтальмологических изысканий.

Животные были подразделены на 3 группы: 1 - контрольная группа (15 крыс), 2 - животные с диабетом и традиционной терапией (10 крыс), 3 - животные с диабетом и сочетанным применением цитофлавина и катахрома (12 крыс).

В крови больных и животных производили определение концентрации никотинамидных коферментов (НАД, НАДН, НАДФ, НАДФН) с помощью циклического энзиматического метода, предназначенного для отдельного определения никотинамидных нуклеотидов в малых количествах исследуемой жидкости и позволяющего точно определить количество коферментов в пределах до 10^{-11} М.

Принцип метода заключается в реакции восстановления тиазола голубого за счет НАДН или НАДФН посредством интермедианта фенозинметасульфата до образования формазана. Реакцию восстановления окисленных никотинамидных коферментов осуществляли с помощью алкогольдегидрогеназы (НАД) и глюкозо-6-дегидрогеназы (НАДФ) при наличии соответствующих субстратов окисления (этанола и глюкозо-6 фосфата соответственно). Окисленные и восстановленные формы коферментов экстрагировали отдельно с помощью соответствующих экстрагентов [4].

Скорость реакции восстановления тиазола определяли по степени изменения адсорбции образующегося формазана (максимум адсорбции при 570 нм). Скорость снижения адсорбции прямо пропорциональна концентрации определяемого кофермента в пробе. В расчетах использовали среднее значение изменения экстинкции за 1 минуту.

Концентрацию никотинамидных коферментов рассчитывали по калибровочной прямой, которую строили с использованием различных концентраций никотинамидных коферментов (от 0,05 нмоль до 0,1 нмоль) [10].

Данные биохимических исследований обрабатывались с помощью соответствующих методов статистического анализа [3].

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования уровня никотинамидных коферментов в крови больных диабетической ретинопатией (основная группа и группа сравнения) представлены на диаграмме (таб.1, рис.1) в

Таблица 1.

Влияние никотинамид содержащих препаратов на содержание никотинамидных коферментов НАД, НАДН, НАДФ и НАДФН в крови больных начальной формой диабетической ретинопатии в группах основной и сравниваемой (контрольная)

Исследуемые показатели	Стат. показат.	Норма	Контрольная группа		Основная группа	
			До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
НАД	n	36	52	52	55	55
	M	92,43	63,78	66,73	62,85	78,57
	m	6,20	5,45	4,32	4,18	5,30
	p	-	<0,001	<0,01	<0,001	>0,05
	%	100	69,0	72,2	68,0	85,0
	p1	-	-	>0,05	-	<0,01
	%1	-	100	104,6	100	125,0
НАДН	n	36	52	52	55	55
	M	16,24	20,33	20,47	20,65	17,91
	m	1,25	1,30	1,37	1,40	1,46
	p	-	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05
	%	100	125,2	126,0	127,2	110,3
	p1	-	-	>0,05	-	<0,05
	%1	-	100	100,7	100	86,7
НАДФ	n	36	52	52	55	55
	M	5,30	4,52	4,42	4,56	4,84
	m	0,35	0,28	0,32	0,34	0,36
	p	-	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	%	100	85,3	83,4	86,0	91,3
	p1	-	-	>0,05	-	>0,05
	%1	-	100	97,8	100	106,1
НАДФН	n	36	52	52	55	55
	M	15,24	11,60	11,92	10,67	12,80
	m	1,14	0,92	0,85	0,90	0,92
	p	-	<0,05	<0,05	<0,01	>0,05
	%	100	76,1	78,2	70,0	84,0
	p1	-	-	>0,05	-	<0,01
	%1	-	100	102,8	100	120,0

Примечания: p- уровень значимости различия данных по отношению к норме; p1- уровень значимости различия данных при сравнении групп основной и контрольной после лечения по отношению к данным до лечения.

виде относительных величин по отношению к соответствующим показателям в норме.

Как видно из представленных данных, в группе сравнения уровень НАД до лечения составил 69%, а после лечения - 72,2%. Рассматривая полученные данные о содержании НАДН, можно отметить, что в группе сравнения до

лечения его уровень составил - 125,2%, а после лечения - 126%. Согласно полученным данным уровень НАДФ у больных с диабетической ретинопатией до лечения составил - 85,3%, а после применения традиционного лечения - 83,4%. Содержание НАДФН у больных группы сравнения до лечения составило - 76,1%, а после лечения - 78,2%.

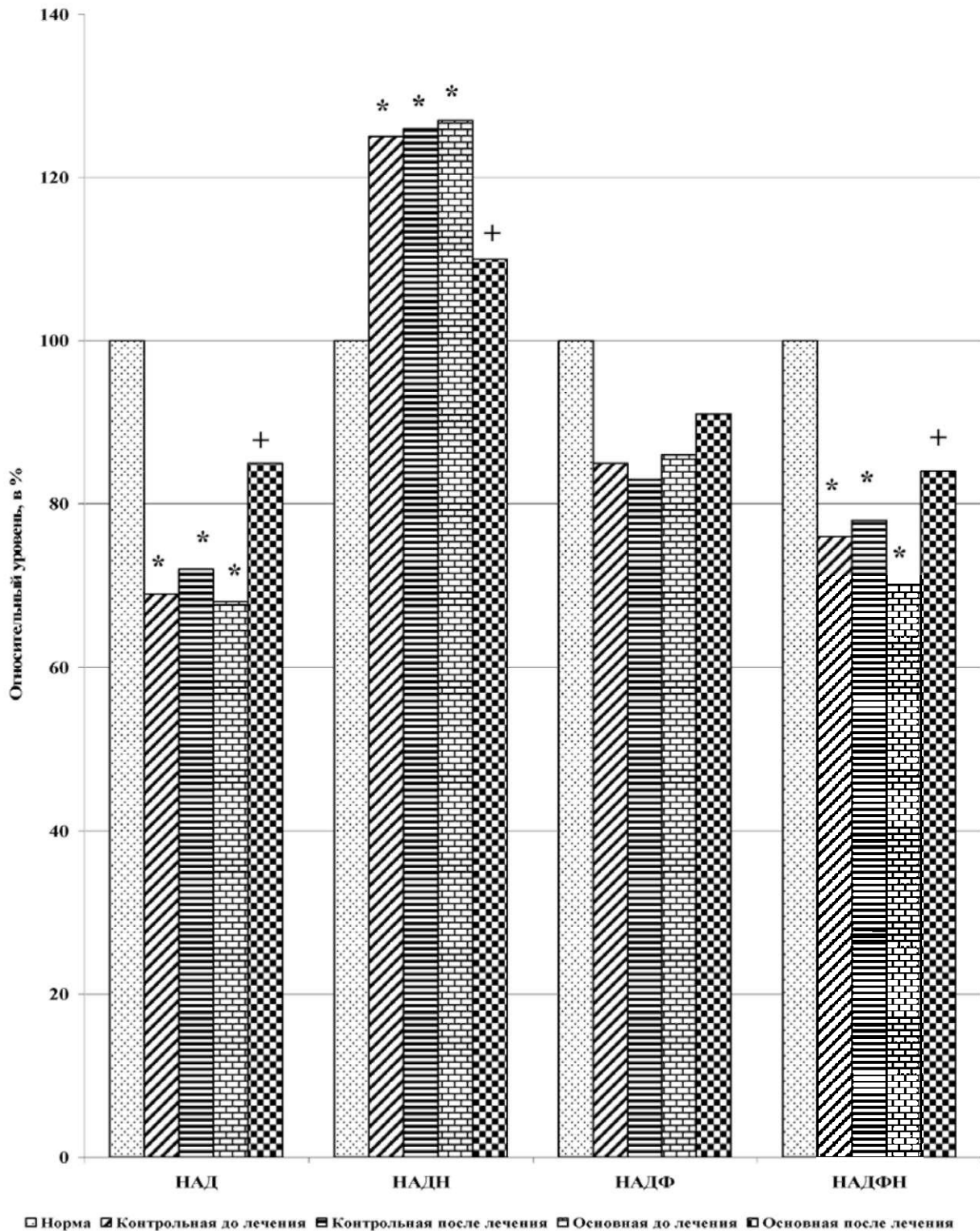


Рис 1. Относительные изменения уровня никотинамидных коферментов в крови больных начальной формой диабетической ретинопатии в группах основной и сравняемой (контрольная) по отношению к норме.

* -уровень значимости по отношению к норме; + - уровень значимости между до и после лечения.

В основной группе больных уровень НАД до лечения составил - 68%, а после применения цитофлавина и катахрома, уровень НАД был повышен до 85%, т.е. повышение составило - 17% по сравнению с нормой, а по сравнению с данными до лечения - на 25%. Содержание НАДН в основной группе до лечения равнялось - 127,2%, а после лечения никотинамид содержащими препаратами - 110,3%, т.е. снизилось на 17% по сравнению с нормой, а по сравнению с данными до лечения - на 13%. Изучая данные о содержании НАДФ у больных основной группы, необходимо указать, что его уровень до лечения составил - 86%, а после лечения - 91,3%, т.е. повышение составило - 5% по сравнению с нормой. Согласно полученным данным уровень НАДФН у больных основной группы до лечения составил - 70%, а после лечения - 84%, т.е. повысился на 14% по сравнению с нормой, а по отношению к данным до лечения - на 20%.

Относительные изменения уровня никотинамидных коферментов в крови животных со стрептозотоциновым диабетом и применении никотинамид содержащих препаратов по отношению к контрольной группе представлены на диаграмме (таб. 2, рис. 2).

Рассматривая полученные данные о содержании никотинамидных коферментов в крови диабетических животных, можно отметить следующее. Уровень НАД у животных до лечения составил - 65%, после лечения - 92% по

сравнению с нормой (98,42±8,4) мкмоль/л. Содержание НАДН до лечения составило - 130%, после лечения - 117,1% по сравнению с нормой (20,54±1,86) мкмоль/л. Уровень НАДФ до лечения составил - 79%, после лечения - 96,1% по сравнению с нормой (6,25±0,46) мкмоль/л. Содержание НАДФН до лечения составило - 66,2%, после лечения - 90% по сравнению с нормой (16,30±1,23) мкмоль/л.

Таким образом в условиях применения препаратов, содержащих никотинамид, можно отметить сдвиг окислительно-восстановительного состояния НАД-пары в сторону большей окисленности. В итоге усиливается окисление глюкозы в печени и угнетается ее биосинтез из не углеводных предшественников в глюконеогенезе.

Обнаруженное нами нормализующее влияние никотинамид содержащих препаратов на концентрацию никотинамидных коферментов в крови больных с диабетической ретинопатией и животных с экспериментальным диабетом, следует рассматривать как важный патогенетически ориентированный механизм благоприятного лечебного воздействия никотинамида при диабете.

Анализируя эти данные, необходимо учитывать, что никотинамид является не токсичным ингибитором ядерного фермента поли (АДФ-рибоза)-полимеразы - ПАРП, который в условиях диабета активируется и интенсивно расщепляет НАД с освобождением соединений рибозы. Последние необратимо повреждают ядерные белки,

Таблица 2.

Влияние никотинамид содержащих препаратов на содержание никотинамидных коферментов НАД, НАДН, НАДФ и НАДФН в крови животных со стрептозотоциновым диабетом

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Контроль	Диабет	Диабет + никотинамид-содержащие препараты
НАД	n	15	10	12
	M	97,13	63,14	89,36
	m	6,65	5,30	6,80
	p	-	<0,001	>0,05
	%	100	65,0	92,0
	p1	-	-	<0,01
НАДН	n	15	10	12
	M	20,30	26,40	23,78
	m	1,72	2,23	1,90
	p	-	<0,05	>0,05
	%	100	130,0	117,1
	p1	-	-	>0,05
НАДФ	n	15	10	12
	M	6,48	5,12	6,23
	m	0,42	0,46	0,40
	p	-	<0,05	>0,05
	%	100	79,0	96,1
	p1	-	-	>0,05
НАДФН	n	15	10	12
	M	16,75	11,09	15,08
	m	1,32	0,96	1,24
	p	-	<0,01	>0,05
	%	100	66,2	90,0
	p1	-	-	<0,05
	%1	-	100	136,0

Примечания: p- уровень значимости различия данных по отношению к контролю; p1- уровень значимости различия данных по отношению к группе "Диабет"

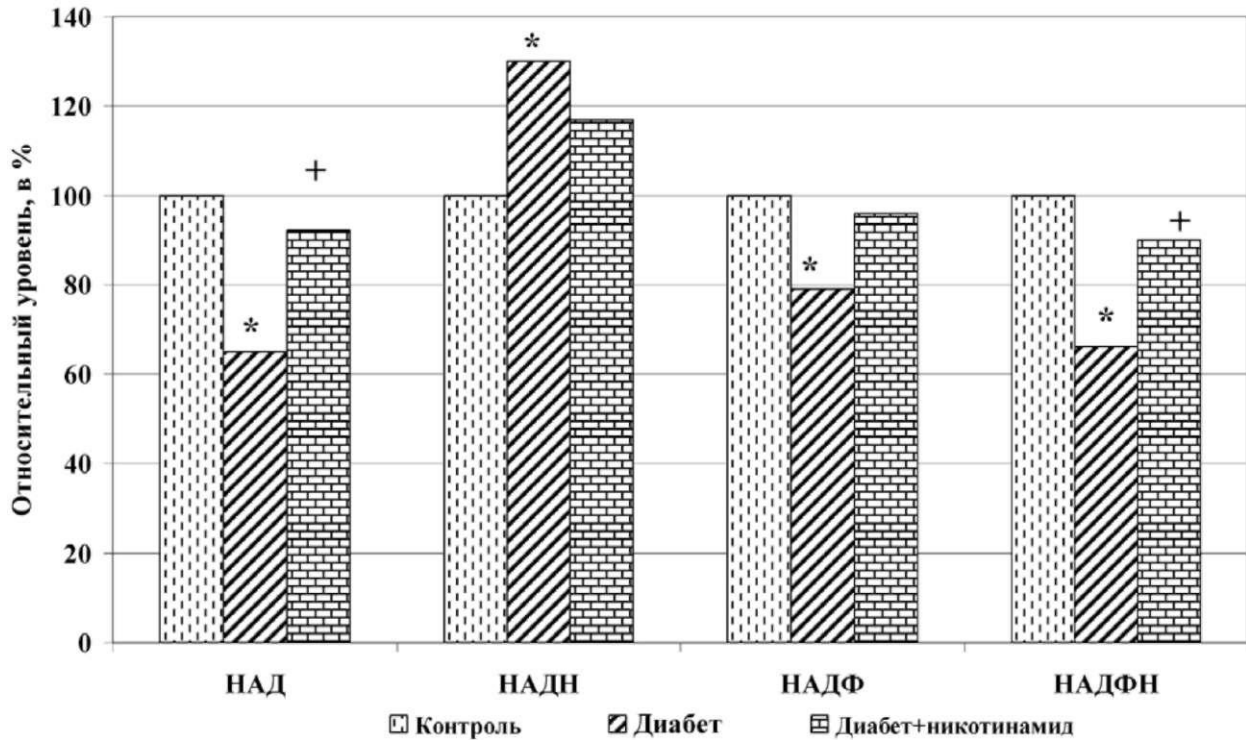


Рис 2. Относительные изменения уровня никотинамидных коферментов в крови животных со стрептозотоциновым диабетом и применении никотинамид содержащих препаратов по отношению к контрольной группе.

* -уровень значимости $p < 0,05$ по отношению к контрольной группе;
 + - уровень значимости $p < 0,05$ по отношению к группе "Диабет".

нарушая процессы транскрипции и генной экспрессии. Наряду с этим, нарушаются энергетические процессы, реакции гликолитического повреждения глюкозы, ингибируется фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, что приводит к активации протеинкиназы С и ядерного фактора κB (NF- κB). Кроме того, значительно стимулируется образование провоспалительных цитокинов, таких как: тумор некротического фактора β интерлейкина - β , интерлейкина - 1 α и резко усиливается образование супероксидных радикалов.

Все перечисленные выше факторы являются важными звеньями механизма развития диабетических осложнений в сетчатой оболочке глаза, таким образом, полученные нами результаты убедительно доказывают целесообразность применения препаратов никотинамида при лечении больных с диабетической ретинопатией.

Выводы:

1. В крови больных непролиферативной формой диабетической ретинопатии выявлены значительные нарушения уровня никотинамидных коферментов. На фоне существенного снижения общего уровня никотинамидных коферментов отмечается повышение содержания восстановленной формы НАДН в среднем на 25%, тогда как концентрация окисленного НАД снижена более чем на 30%, а уровень НАДФ и НАДФН понижен в среднем на 15% и 24% соответственно.

2. После курсового применения препаратов, содержащих никотинамид (цитофлавин, катахром) в медикаментозной терапии в основной группе пациентов значительно повышается уровень окисленной формы НАД (на 25%)

и восстановленной формы НАДФН (на 20%). С учетом снижения концентрации восстановленного НАДН (на 12%) окислительный потенциал системы никотинамидных коферментов повышается, что является положительным элементом благоприятного метаболического воздействия изучаемых лекарственных препаратов.

3. Данные, полученные при определении уровня никотинамидных коферментов в крови животных со стрептозотоциновым диабетом в условиях применения никотинамид содержащих препаратов, также выявили повышение концентрации окисленной формы НАД (на 41,5%) и восстановленной формы НАДФН (на 36,4%), при одновременном снижении восстановленного НАДН (на 10%).

Рецензент: д.мед.н., профессор Скрипник Р.Л.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Александровский А. Я. Молекулярные механизмы развития диабетических осложнений. // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 11. — С. 1470 — 1479.
2. Великий М. М., Бурда В. А., Биронт Н. Б. Влияние никотинамида на активность ферментов антиоксидантной защиты при экспериментальном диабете // Укр. биохим. Журн. — 1996. — Т. 68. — № 2. — С. 109-114.
3. Наследов А. SPSS компьютерный анализ данных в психологии и социальных науках. // Спб.: Питер, 2005. — 416 с.
4. Новые методы биохимического анализа. // Изд. Ленинградского универ. — 1991. — 395 с.
5. Олейник Т. В. Современные патогенетически ориентированные пути профилактики и лечения начальных

стадий диабетической ретинопатии: автореф. дис. ...докт. мед. наук: спец.14.01.18 — "Офтальмология" / Олейник Т. В. — Одесса, 2010. — 25 с.

6. Павлюченко К. П., Олейник Т. В. Исследование окислительно-восстановительного состояния никотинамидных коферментов в сетчатке при моделировании стрептозотоцинового диабета // Офтальмол. Журн. — 2004. — № 5. — С. 70-73.

7. Alenzi F. Q. Effect of nicotinamide on experimental induced diabetes // Iran J. Allergy Asthma Immunol. — 2009. — Vol. 8. — № 1. — P. 11-18.

8. Belenky P., Bogan K. L., Brenner C. NAD⁺ metabolism in health and disease // TRENDS in Biochem. Sci. — 2006. — Vol. 32. — P. 12-19.

9. Bergamini C. M., Gambetti S., Dondi A. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. // Cur. Pharm. Design. — 2004. — Vol. 10(14). — P. 1611—1626.

10. Bergmeyer H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. — Herausgegeben von H. U. Bergmeyer. — Berlin. — 1986. — S. 2254—2265.

11. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications (a unifying mechanism). // J. Diabetes. — 2005. — Vol. 54. — P. 1615—1625.

12. Crino A., Schiaffini R., Ciampalini P. A two year observational study of nicotinamide and intensive insulin therapy in patients with recent onset type 1 diabetes mellitus // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. — 2005. — Vol. 18. — P. 749—754.

13. Kanwar M., Chan P.-S., Kern T. S. Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — Vol. 47. — P. 1594—1599.

14. Klaidman L. K., Mukherjee S. K., Adams J. D. Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide // Biochim. Biophys. Acta. — 2001. — Vol. 1525. — P. 136-148.

15. Kowluru R. A. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. // Antioxid. & Redox. Signal. — 2005. — Vol. 7(11-12). — P. 1581-1587.

16. Kowluru R. A., Chan P. S. Oxidative stress and diabetic retinopathy. - Exp. Diabet. Res. - 2007. - 12 p.

17. Lin S-J., Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease // Curr. Opin. Cell Biol. - 2003. - Vol. 15. - P. 241-246.

18. Lorenzi M., Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. // Diabetologia. - 2001. - Vol. 44. - P. 791 - 804.

19. Sauve A. A. NAD⁺ and vitamin B3: from metabolism to therapies // J. Pharm. Exp. Ther. - 2008. - Vol. 324. - P. 883-893.

20. Stevens M. J., Li F., Drel V. R. Nicotinamide reverses neurological neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats // J. Pharm. Exp. Ther. - 2006. - P. 1-20.

21. Vidal J., Fernandez-Balsells M., Aguilera E. Effects of nicotinamide and intravenous insulin therapy in newly diagnosed type 1 diabetes // Diabetes Care. - 2000. - Vol. 23. - № 3. - P. 360-364.

22. Wang J., Zhai Q., Chen Y. A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration // J. Cell Biol. - 2005. - Vol. 170. - P. 349-355.

23. Wilkinson-Berka J., Miller A. Update on the treatment of diabetic retinopathy. // The Scientific World J. - 2008. - Vol. 8. - P. 98 - 120.

ВПЛИВ НИКОТИНАМІДНИХ ПРЕПАРАТІВ НА КОНЦЕНТРАЦІЮ НИКОТИНАМІДНИХ КОФЕРМЕНТІВ У КРОВІ ХВОРИХ З НЕПРОЛІФЕРАТИВНОЮ ДІАБЕТИЧНОЮ РЕТИНОПАТІЄЮ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Ахмад Абед Аль Рахім Абдаллах Акрабаві,
В.Н.Саковіч

ДЗ "Дніпропетровська медична академія"
МОЗ України"

Вплив нікотинамід утримуючих препаратів на концентрацію нікотинамідних коферментів у крові хворих з непроліферативною діабетичною ретинопатією і в експерименті. Нами проведено дослідження впливу нікотинамід утримуючих препаратів (Цитофлавін і катахром) на концентрацію нікотинамідних коферментів у крові хворих з непроліферативною діабетичною ретинопатією і в експерименті. Доведено що після курсового застосування препаратів, що містять нікотинамід (Цитофлавін, катахром) в медикаментозній терапії в основній групі пацієнтів та у тварин значно підвищується рівень окисленої форми НАД і відновленої форми НАДФН, НАДФ, зниження концентрації відновленого НАДН.

Ключові слова: непроліферативна діабетична ретинопатія, експеримент, лікування, нікотинамідних коферментів.

INFLUENCE OF NIKOTINAMID MEDICATIONS ON THE LEVEL OF NIKOTINAMIDS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH NONPROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

Ahmad Abed Al Raheem Abdallah Aqrabawi,
V.N. Sakovich

Dnipropetrovsk State Medical Academy,
Dnipropetrovsk, Ukraine

Summary: Effect of nicotinamide-containing drugs at the concentration of nicotinamide coenzymes in the blood of patients with non-proliferative diabetic retinopathy and in the experiment. We investigated the effect of nicotinamide containing drugs (cytoflavin and catachrom) the concentration of nicotinamide coenzymes in the blood of patients with non-proliferative diabetic retinopathy and in the experiment. Proved that after a course of preparations containing nicotinamide (cytoflavin, catachrom) in medical therapy in the study group patients and in animals significantly increased levels of oxidized and reduced forms of NAD NADPH NADPH, reduced concentration of reduced NADH.

Key words: non-proliferative diabetic retinopathy, experiment, treatment, nicotinamide coenzymes