

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра біохімії

Дипломна робота спеціаліста

**на тему: «Метаболізм рибофлавіну до його коферментних форм в
тканинах щурів різного віку »**

«The metabolism of Riboflavin in its coenzyme forms in the tissues of rats of different age»

Виконала: студентка заочної
форми навчання
спеціальність 091. Біологія
Грабчак Ольга Ігорівна

Науковий керівник:
кандидат біологічних наук, доцент
Федорко Наталія Леонідівна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Єлинська Наталія Олексіївна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ ____ від ____ р.
Завідувач кафедри
____ Петров С.А.
(підпис)

Захищено на засіданні ДЕК № 1
протокол № ____ від ____ 2017 р.
Оцінка ____ / ____ / ____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)
Голова ЕК №1
____ Філіпова Т.О.
(підпис)

2017

ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, МОВНИХ ПОЗНЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АДФ – аденозинтрифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат, аденозинтрифосфорна кислота

ДЕАЕ- целюлоза – диетиламіноетилцелюлоза

КМ – целюлоза - карбоксиметилцелюлоза

КФ - креатинфосфат

НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФН - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

РФ – рибофлавін

ФАД – флавінаденіндинуклеотид

ФМН – флавінмононуклеотид

АНОТАЦІЯ

Визначено вміст загального рибофлавіну, його коферментних форм: ФАД і ФМН та некоферментної форми – люміфлавіну у гомогенатах органів щурів різного віку.

В досліджених органах щурів всіх вікових груп флавіни розподілялись з пониженням їх вмісту у такому порядку: печінка, нирки, серце, мозок, але найбільший їх вміст відзначене у 3-х місячних щурів. В органах щурів всіх вікових груп найбільший вміст зі всіх флавінів представлено ФАД, який на порядок був нижчим в мозку у порівнянні з іншими досліджуваними органами.

У статевозрілих і старих щурів вміст ФАД і ФМН у всіх досліджених органів був в 1,5 і 2 рази меншим відповідно таких показників у молодих щурів.

Вміст некоферментної форми рибофлавіну – люміхрому був найбільшим у всіх досліджуваних органах у молодих щурів, а найменшим – у статевозрілих щурів.

Роботу виконано на 44 сторінках, вона містить 10 рисунків. Наведено посилання на 50 джерел літератури (19 кирилицею та 31 латиницею).

Ключові слова: *рибофлавін, флавінаденіндинуклеотид, флавінаденінмононуклеотид, люміхром, щури.*

SUMMARY

Determined content of total riboflavin, coenzyme its forms: FAD and FMN and nekofermentnoyi form - lyumiflavinu in homogenates of rats of different ages.

In the studied organs of rats of all ages flavin distributed with decreasing their content in the following order: liver, kidneys, heart, brain, but most of the content was observed in 3-month rats. In the organs of the rats of all age groups with the highest content of FAD flavin submitted that the order was lower in the brain than other organs studied.

In the mature and old rats FAD and FMN contents in all investigated organs were 1.5 and 2 times smaller then under such indicators in young rats.

Content nekofermentnoyi form of riboflavin - lyumihromu was the largest in all organs investigated in young rats, and the least - in mature rats.

This paper describes 44 pages it contains 10 figures. Show link 50 to literature sources (19 cyrillic and 31 latin)

Key words: *riboflavin, flavinadeninedinucleotyde, flavinadeninmononukleotyde, lyumihrom, rats.*

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Структура і біологічна роль рибофлавіну.....	6
1.2. Біохімічна роль флавінових ферментів.....	9
1.3. Основний обмін з участю рибофлавіну в онтогенезі.....	13
1.3.1. Вікові особливості гліколітичного фосфорилування.....	14
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	19
2.1. Місце і матеріали дослідження	19
2.2. Методи дослідження	20
2.2.1. Екстракція флавінів з тканин щурів	20
2.2.2. Колонкова іонообмінна хроматографія.....	20
2.2.3. Підготовка колонки до аналізу.....	21
2.2.4. Визначення флавінів флуориметричним методом.....	21
2.2.5. Статистична обробка результатів.....	22
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
3.1. Колонкова хроматографія суміші стандартів флавінів.....	24
3.2. Вміст флавінів в органах щурів різного віку.....	29
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	36
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	40

ВСТУП

З віком вже в звичайних умовах життєдіяльності організму мобілізуються резерви посилення енергетичних процесів і використання можливостей пристосування енергетики до постійно мінливих умов існування. В кінцевому підсумку це призводить до наростання з віком порушень енергетичного обміну і може служити однією з причин зниження основного обміну і функцій при старінні.

Вітамін В₂ викликає значний інтерес в спробі пояснення метаболічного механізму старіння, оскільки при його авітамінозі проявляються симптоми характерні для старіння - зупинка росту, порушення ЦНС, мігрень, катаракта та ін. Якщо врахувати, що рибофлавін бере участь в окислювальних процесах, багато з яких протікають з утворенням енергії, то стає зрозумілим, чому прояви недостатності вітаміну відбиваються, передусім, на тканинах, які регенерують.

Враховуючі існуючі дослідження, не до кінця зрозумілим залишається метаболізм рибофлавіну в тканинах та органах в онтогенезі. Тому, в межах діяльності кафедри метою наших досліджень було визначення вмісту рибофлавіну, його коферментних форм і люміхрому в органах щурів різного віку. Щодо виконання поставленої мети вирішували наступні задачі:

1. Визначити вміст рибофлавіну, коферментних форм: ФАД, ФМН і люміфлавіну із суміші стандартів методом колонкової іонообмінної хроматографії.
2. Визначити вміст рибофлавіну, коферментів рибофлавіну: ФАД, ФМН і люміхрому в органах щурів різного віку.
3. Оцінити особливості розподілу флавінів в органах щурів різного віку.

Об'єкти дослідження : вітамінний статус в геронтогенезі

Предмет дослідження: метаболізм рибофлавіну у щурів різного віку

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Зниження основного обміну з віком - еквівалент зниження життєздатності. Особлива увага змінам в метаболізмі організму в онтогенезі за участю рибофлавіну приділяється на ланках енергетичного обміну.

Слід відзначити значення гіпоксії в геронтогенезі, коли, крім інволюційних змін, приєднуються явища серцево-судинної і легеневої недостатності. При порушенні кисневого режиму значно посилюються метаболічні зрушення, характерні для пізнього онтогенезу, зокрема активація вільнорадикального окислення.

Відбувається зниження поглинання кисню тканинами, (особливо-серцевого м'яза) в ендogenous диханні і в присутності субстрата. Кількість піридинових коферментів в старості збільшується за рахунок їх відновлених форм, що відображає порушення на початковій ділянці ланцюга дихання мітохондрій. Зміст цих коферментів збільшується в цитоплазмі і знижується в мітохондріях. У перерахунку на одиницю білка мітохондрій активність цитохромоксидазної системи мітохондрій зростає і збільшується спряженість процесів дихання з фосфорилуванням, але в розрахунку на одиницю білка тканини - знижується.

Розвиток тканинної гіпоксії також вносить свій внесок в розвивається з віком енергодефіцит тканин. Відзначено підвищення потужності лактатобразуючих і лактат-утилізуючих механізмів в тканинах, а також - утилізації амінокислот в реакціях глюконеогенезу, підвищення активності гексокінази.

Отримані дані про вміст флавінонів в органах щурів різного віку вказують на їх однонаправленість, але в кожному віці відзначене свої особливості.

В досліджених органах всіх вікових груп щурів вміст флавінів зі зниженням розміщувались у такому порядку: печінка, нирки, серце, мозок, але найбільший їх вміст відзначене у 3-х місячних щурів.

Результати проведених досліджень знаходяться в повній відповідності з даними літератури []. Вони свідчать про неоднаковий рівень стійкості гепатоцитів дорослих і старих щурів до ініціації вільно-радикальних реакцій. Причиною того можуть бути вікові відмінності в структурі мембран клітин печінки.

Отримані дані підтверджують наявні в літературі відомості про віковий збільшенні інтенсивності вільно-радикальних процесів в міокарді при старінні. Зменшення чутливості міокарда до ініціації вільно-радикальних процесів при старінні набуває важливого значення в віковому зміні резистентності серця до стресу [].

Слід відзначити, що в органах щурів всіх вікових груп найбільший вміст представлене ФАД, але в мозку щурів всіх вікових груп визначено вміст ФАД на порядок нижчим у порівнянні з іншими досліджуваними органами. За умов старіння виникає виражена тенденція в зменшенні питомої ваги катаболізму вуглеводів і збільшення - катаболізму ліпідів, що свідчить про тенденцію до зміни домінуючого субстрату окислення. Мозок має високу стійкість до вікових змін вмісту кінцевих продуктів азотистого обміну (сечовини і сечової кислоти) навіть в умовах вираженого стресового впливу.

З віком ми спостерігали у щурів зменшення вмісту ФАД і ФМН у всіх досліджених органах: у статевозрілих щурів у порівнянні з молодими - в 1,5 рази, а у старих щурів вміст рибофлавіну та всіх його коферментних форм відзначено у 2 рази нижче у порівнянні з такими показниками у молодих і статевозрілих щурів.

Вміст некоферментної форми рибофлавіну – люміхрому був найбільшим у всіх досліджуваних органах у молодих щурів, а найменшим – у статевозрілих щурів.

Отримані результати досліджень відзеркалюють перш за все зниження метаболізму в окремих органах відповідно їх фізіологічного навантаження та резистентності до вільно-радикальних процесів при старінні, а також перерозподіл субстратів окислення з метою вилучення енергії.

При старінні виникає виражена тенденція в зменшенні питомої ваги катаболізму вуглеводів і збільшення - ліпіди, що свідчить про тенденцію до зміни домінуючого субстрату окислення. Мозок має високу стійкість до вікової зміни вмісту кінцевих продуктів азотистого обміну (сечовини і сечової кислоти) навіть в умовах вираженого стресового впливу.

Печінка, на відміну від мозку, проявляє лабільність по відношенню до рівня цих метаболітів. Більшою мірою вона проявляється в період статевого дозрівання і при старінні.

У пізньому пубертатному віці в цитоплазмі клітин печінки виникає певне «напруження» в азотистом обміні, наслідком якого стає зниження потужності антиоксидантної захисту цитозоля, за рахунок зниження вмісту в ньому кінцевих продуктів метаболізму, що володіють вираженою антиоксидантною активністю. Причина того може бути характерна для цього віку перебудови в системі гормональної регуляції метаболізму. Зменшення вмісту низькомолекулярних антиоксидантів зумовлює підвищення базального рівня процесів вільнорадикального окислення ліпідів в печінці на даному етапі онтогенезу. В умовах стресу в гепатоцитах виникають компенсаторні зрушення, пов'язані з накопиченням продуктів азотистого обміну, проявляють антиоксидантні властивості.

ВИСНОВКИ

1. В досліджених органах щурів всіх вікових груп флавіни розподілялись з пониженням вмісту у такому порядку: печінка, нирки, серце, мозок, але найбільший їх вміст відзначено у 3-х місячних щурів.
2. В органах щурів всіх вікових груп найбільший вміст зі всіх флавінів представлено ФАД.
3. В мозку щурів всіх вікових груп визначено вміст ФАД на порядок нижчим у порівнянні з іншими досліджуваними органами.
4. У статевозрілих щурів вміст ФАД і ФМН у всіх досліджених органів був в 1,5 рази меншим за таких показників у молодих щурів.
5. У старих щурів вміст рибофлавіну та всіх його коферментних форм відзначено у 2 рази нижче у порівнянні з такими показниками у молодих і статевозрілих щурів.
6. Вміст некоферментної форми рибофлавіну – люміхрому був найбільшим у всіх досліджуваних органах у молодих щурів, а найменшим – у статевозрілих щурів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. — СПб.: Наука, 2003. — 468 с.
2. *Арутюнян, А.В.* Механизмы свободнорадикального окисления и его роль в старении Текст. / А.В. Арутюнян, Л.С. Козина // Успехи геронтологии, 2009.-№ 1.- С. 104-116.
3. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы в биологических системах// Сорос, образоват. журнал. – 2000.- № 12. – С. 13-19.
4. *Дмитревич И.Н., Пругло Г.Ф., Фёдорова О.В., Комиссаренков А.А.* Физико-химические методы анализа. Ч.III. Хроматографические методы анализа: учебное пособие для / СПб ГТУРП. - СПб., 2014.-53с.
5. *Зефилов Н. С., Кулов Н. Н. и др.* Химическая энциклопедия. Том 4. — Москва: Научное издательство «Большая российская энциклопедия», 1995. — С. 266—267.
6. *Колесниченко, Е.В.* Исследование перекисного окисления липидов и уровня мозгового нейротрофического фактора у больных шизофренией // Неврологический вестник. 2008. - Т. XL. - вып. 3. - С. 47 - 50.
7. *Кольман Я., Рём К.Г.* Наглядная биохимия. —М. : Мир, 2000. — 469 с.
8. *Кольтовер, В.К.* Свободнорадикальная теория старения: - исторический очерк // Успехи геронтологии.-2000.-Вып. 4.- С. 33-40.
9. *Константинов Ю.М.* Дисфункция митохондрий при нейродегенеративных заболеваниях // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2010. - № 5 – С. 87-91.
10. *Кэтрин Прайс.* Витамания: История нашей одержимости витаминами. — Penguin press, 2015. – 291 с.

11. *Лукина М. М., Ширманова М. В., Сергеева Т. Ф.* Метаболический имиджинг в исследовании онкологических процессов (обзор) // СТМ. – 2016 — том 8. – №4. – С. 113-126.
12. *Лукьянова Л.Д.* Современные представления о биоэнергетических механизмах адаптации к гипоксии // Нур. Мед. J. – 2002. – Т. 10, № 3–4. – С. 30–43.
13. *Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В.* Биохимия человека: в 2 томах. – М.: Мир; БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 414 с.
14. *Петровский К.С.* Гигиена питания. – М. «Медицина», 1975. – 329 с.
15. *Розанов А. Я.* Экспериментальная витаминология, Минск, 1979. – 224 с.
16. *Розенфельд А. Д.* Регуляция сукцинатом вклада митохондрий в поддержание рН при АТФ-азных нагрузках : автореф. дис. ... канд. мед.
17. *Рудаков О.Б. Востров И.А.* Спутник хроматографа. — Воронеж: Водолей, 2004. — 528 с.
18. *Северин Е. С.* Биохимия: Учеб. для вузов. - ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 779 с.
19. *Чиркин А.А., Горовая М.В.* Рибофлавин: биологические, медицинские и экологические аспекты // ученые записки УО ВГУ ИМ. П. М. Машерова. – Т. 3. – 2004. – С. 244-258
20. *Ames B.N.* Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases // Mech Ageing Dev. – 2010. – Vol. 131. – P. 473-479.
21. *Ames, B.N.* Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases // Mech Ageing Dev. 2010. - Vol. 131.-№7-8.- P. 473-479.
22. *Arpad G. Fazekas* Age dependence of thyroxine stimulation of riboflavin incorporation into flavin coenzymes in liver and brain // Endocrinology . – 197. – Vol. 102 (2). – P. 641-648.
23. *Boehnke C., Reuter U., Flach U., Schuh-Hofer S., Einhäupl K.M., Arnold G.* High-dose riboflavin treatment is efficacious in migraine prophylaxis: an open study in a tertiary care centre // Eur J Neurol.– 2004. –Vol. 11(7). – P. 475-477.
24. *Cooperman J. M., Lopez R.* Handbook of vitamins // Nutritional, biochemical and clinical aspects, ed. by L. Y. Machlin, N.Y. – Basel. – 1984. – P. 299-327.

25. *European convention* for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe // 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. - 52 p.
26. *Foy H, Kondi A.* Serum B-12 and Folate Levels in Normal and Riboflavin Deficient Baboons // *Brit. J. Haematology.* – 1966. – Vol.12. – p. 234-242.
27. *Gerald F. Combs, Jr., James P. McClung.* The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health, 2016. – 596 p.
28. *Grininger M, Staudt H, Johansson P, Wachtveitl J, Oesterhelt D.* Dodecin is the key player in flavin homeostasis of archaea // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284(19). – P. 13068-13076.
29. *Hazai E, Bikadi Z.* Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2) / *J Struct Biol.* – 2008. – № 162 (1). – P. 63–74.
30. *Hille, Miller, Palfrey.* Handbook of Flavoproteins. – Walter de Gruyter & Co, 2013 – 351 p.
31. *Jun Okuda, Junko Nagamine.* Metabolism of injected flavins studied by using double-labeled [¹⁴C] flavin adenine dinucleotide and [¹⁴C, ³²P] flavin mononucleotide // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* –1978. – Vol. 24. – P. 505-510.
32. *Kalkan S., Aygoren O., Akgun A.,* Do adenosine receptors play a role in amithriptyline-induced CV toxicity in rats? // *J. Toxicol. Clin. Toxcol.* – 2004. –№ 42 (7). – P. 945–954.
33. *Kendell S. et al.* Principles of neural sciences // Appleton & Lange. – 2000. – 1134 p.
34. *Kramer K.M., Haber J.E.* New telomeres in yeast are initiated with a highly selected subset. – 1993. – P. 89–93.
35. *Leclerc J.* Thiamine, riboflavin and vitamin B₆ contents of organs in the aged rat. I. Effect of vitamin supplementation administered in drinking water // *Ann Nutr Aliment.* – 1977- Vol. 31(1). – P. 19-25.
36. *Leclerc J.* Tissue thiamine, riboflavin and vitamin B₆ in the aged rat. II. Effects of vitamin supplementation in the diet on the excretion of vitamins and its tissue levels // *Ann Nutr Aliment.* – 1978. – Vol. 32(4). – P.753-763.

37. *Leonor Michaelis; Schubert M. P.; Smythe C. V.* Potentiometric Study of the Flavins// J. Biol. Chem. – Vol. 116(2). – P. 587–607.
38. *Mary Campbell, Shawn Farrell.* Biochemistry. – Thomson books, 2009. – 750 p.
39. *Namrata Chhabra, Sahil Chhabra.* A Case Oriented Approach Towards Biochemistry. – JP Medical Ltd, 2012. –698 p.
40. *Nath R.* Health and disease role of micronutrients and trace elements: recent advances in the assessment of micronutrients and trace elements deficiency in humans. – APH Publishing, 2000 – 636 p.
41. *Ogunleye A.J., Odutuga A.A.* The effect of riboflavin deficiency on cerebrum and cerebellum of developing rat brain // J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). – 1989. – Vol. 35(3). – P. 193-197.
42. *Patel M., Vadlapatla R.K., Pal D., Mitra A.K.* Molecular and functional characterization of riboflavin specific transport system in rat brain capillary endothelial cells // Brain Res. – 2012. – Vol.1468. – P. 1-10.
43. *Paul D. Boyer.* The enzymes. Vol. XII, part B – Academic press, N.Y., 1975. – 613 p.
44. *Pentel P., Wananukul W., Scarlett W.* NO contributes to deziperamine – induced hypotension in rats. // Hum. Exp. Toxicol. – 1996. – Vol. 15. – P. 320–328.
45. *Mortera P, Herculano-Houzel S.* Age-related neuronal loss in the rat brain starts at the end of adolescence. //Frontiers in Neuroanatomy. – 2012. - №6. – P. 45-49.
46. *Reynold Spector.* Vitamin transport diseases of brain: focus on folates, thiamine and riboflavin // Brain Disord Ther. – 2014. – Vol.3. – doi: 10.4172/2168-975X.1000120.
47. *Richard Rivlin.* Riboflavin. – Plenum press, 1975. – 430 p.
48. *Schmitz G, Langmann T, Heimerl S.* Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism // J. Lipid Res. – 2002. – Vol. 42 (10). – P. 1513–1520.
49. *Schoenen J, Jacquy J, Lenaerts M.* Effectiveness of high-dose riboflavin in migraine prophylaxis. A randomized controlled trial // Neurology. – 1998. – Vol.50. – №2. – P. 466-470.

50. *Wagner J. R., Axelrod A. E.* A rat assay method for the determination of riboflavin // *The Journal Of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 136. – P. 357-364.