



УДК 577.164.12

Вплив трансплантації м'язової тканини в одноплідних щурів на загальну кількість флавінів та ФАД

С.М. Кобильник¹, І.Л. Вовчук¹, О.О. Дузенко², С.М. Козишкурт¹, Д.В. Морозова¹, С.А. Петров¹

¹Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса, Україна

²Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Досліджено баланс рибофлавіну та його метаболітів у м'язових тканинах до та після трансплантації в одноплідних щурів та за умов операції без підсадки. В основу визначення флавінів покладено метод Юденфренда. В експерименті трансплантацію проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–300 г. Тварин виводили з експерименту шляхом пропускання електричного струму через довгастий мозок. В одноплідних щурів-донорів брали черевну м'язову тканину, яку підшивали до гомілкової м'язової тканини реципієнта. Таку саме процедуру проведено зі стегною м'язовою тканиною. У разі операції без підсадки проведено такі самі маніпуляції, виключаючи етап трансплантації (для визначення впливу хірургічного втручання). Контролем слугувала тканина, яка не підлягала хірургічним втручанням. Досліджувані показники визначали на першу, третю та сьому добу після трансплантації. Трансплантація м'язових тканин не викликала змін кількості загальних флавінів. Уміст РФ + ФМН під час трансплантації м'язової тканини в одноплідних щурів зумовлював достовірне зменшення цього показника у стегновій м'язовій тканині донора та у черевній м'язовій тканині реципієнта на третю добу дослідження відносно контролю. Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів викликала збільшення кількості ФАД на третю добу експерименту у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта. Таким чином, трансплантація стегнової м'язової тканини одноплідних щурів сприяє прискоренню синтезу ФАД з рибофлавіну та ФМН.

Ключові слова: трансплантація; рибофлавін; ФМН; ФАД

Effect of transplantation of muscle tissue in rats from the same litter on total number of flavins and FAD

S.N. Kobylnik¹, I.L. Vovchuk¹, O.O. Dosenko², S.N. Kozishkurt¹, D.V. Morosova¹, S.A. Petrov¹

¹Mechnikov Odessa National University, Odessa, Ukraine

²Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Riboflavin is a member of redox enzymes involved in fatty acid oxidation and energy generation. Important role of this vitamin is in reproductive function. Exchange of transformation of riboflavin in animal tissues and cells of microorganisms include reactions that lead to synthesis and subsequent collapse of FMN and FAD. It is involved in enhancing antitumor activity of many anticancer drugs, as well as activation of the immune system to kill tumor cells. Issues of transport of riboflavin and its derivatives in animals have been studied enough. Investigations of changes of the balance of riboflavin and its metabolites in muscular tissues before transplantation in rats from one litter and at operation without replanting were conducted, based on the Udenfriend method of flavin determination. Transplantation in the experiment was carried out on white non-linear male rats weighing 180–300 g. Animals were taken out of the experiment by passing electric current through the medulla. Belly muscular tissue was taken from donor rats of the same litter, and that tissue was sewn to homologous muscular tissue of the recipient. The same procedure was carried out with femoral muscular tissue. In the course of operation without replanting the same manipulations have been made except for transplantation stage (for determination of the effect of surgical intervention). Tissue not subject to any surgical intervention served as a control. Parameters of the study were measured on the first, third and seventh days after

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Шампанський провулок, 2а, Одеса, 65069, Україна
Mechnykov Odesa National University, Champagne Lane, 2a, Odessa, 65069, Ukraine

Одеський національний медичний університет, вул. Ольгіївська, 4, Одеса, 65069, Україна
Odesa National Medical University, Olgievskaya str., 4, Odessa, 65069, Ukraine
E-mail: Kobylnik71@mail.ru

transplantation. Transplantation of muscular tissue caused no changes in total flavin amount. Content of RF + FMN after transplantation of muscular tissue in rats of the same litter decreased in femoral muscular tissue of the recipient. Transplantation of muscular tissues in rats from the same litter lead to increase in FAD amount in femoral muscular tissue of the donor and recipient on the third day of the experiment. Transplantation of femoral muscular tissue lead to acceleration of FAD synthesis from riboflavin and FMN.

Keywords: transplantation; riboflavin; FMN; FAD

Вступ

Вітамін В₂ (рибофлавін) входить до складу двох коферментів: флавінмононуклеотиду (ФМН) та флавінаденіндинуклеотиду (ФАД), що є компонентами таких ензимів як сукцинатдегідрогенази, цитохромредуктази, жовтого дихального ферменту, діафори, оксидаз амінокислот тощо. Рибофлавін входить до складу окисно-відновних ферментів, що беруть участь в окисненні жирних кислот і утворенні енергії (Shpichka, 2011). Також важлива роль цього вітаміну у репродуктивній функції (Shinagava, 1956). Беручи участь у тканинному диханні, вітамін В₂ забезпечує нормальне функціонування безсудинних (епітеліальних) тканин, кришталика та тканин, найчутливіших до нестачі кисню (наприклад мозкових). Рибофлавін необхідний для утворення (входить до складу гідроксилази фенілаланіну) та руйнування (регулює активність моноаміноксидази) моноамінів як у ЦНС, так і у периферійних тканинах. Вітамін В₂ сприяє синтезу еритропоєтину, через утворення якого нервова та ендокринна системи регулюють кровотворення. Активована рибофлавіном піридоксалькіназа перетворює піридоксин (вітамін В₆) на його активну форму – піридоксальфосфат.

Останнім часом все більше місця в медико-біологічній практиці посідають різноманітні методи тканинної терапії. Доведено, що скелетна м'язова тканина, так само як і деякі інші органи, має властивість до репаративної регенерації (Danilov, 2007). Питання розподілу рибофлавіну та його похідних при трансплантації м'язової тканини одноплідних щурів майже не досліджені.

Мета даної статті – оцінити баланс рибофлавіну та його похідних до та після трансплантації м'язових тканин в одноплідних щурів за умов операції без підсадки.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження виконані на базі лабораторії кафедри біохімії ОНУ ім. І.І. Мечникова. Трансплантацію проводили на білих безпорідних щурах-самцях масою 180–360 г. У роботі дотримано вимог Європейської конвенції про захист тварин, яких використовують з експериментальною метою. Донорами м'язової тканини виступали щури з одного посліду. У щурів-донорів вилучено стегнову м'язову тканину та підшито до стегнової м'язової тканини щурів-реципієнтів. Аналогічну процедуру проведено з червону м'язовою тканиною. Операцію без підсадки виконано для порівняння впливу хірургічного втручання на досліджувані показники. Контролем слугувала тканина, яка не підлягала хірургічним втручанням.

В основу визначення флавінів покладено метод Юденфренда (Judenfreund, 1967) зі змінами, що виникли в результаті його адаптації до умов нашого експерименту. Весь аналіз (за винятком гідролізу) проводили на холоді, за температури 0...–4 °С. Свіжу тканину гомогенізували

на фізіологічному розчині (10 мл/г тканини). 1 мл гомогенату переносили у пробірку, що містила 4 мл 11% ТХУ, перемішували та через 15 хв центрифугували за 3 000 обертів/хв. Одну аліквотну пробу (А₁), що містила 2 мл надосадової рідини, переносили в іншу пробірку з 8 мл 0,2 М розчину КН₂РО₄, після перемішування рН розчину становила 6,8. Цю суміш витримували у темряві протягом ночі. Іншу аліквотну пробу (А₂), яка так само містила 2 мл звільненого від білка екстракту, переносили у пробірку та зберігали протягом ночі у темряві за 38 °С для того, щоб відбувся гідроліз ФАД; після цього до суміші додавали 8 мл 1 М розчину К₂НРО₄. Після нейтралізації флавіни дуже чутливі до світла, тому до вимірювань їх зберігали у темряві.

Стандарти готували, використовуючи 2 мл відомого розчину рибофлавіну (містить 0,03–2 мкг рибофлавіну).

Для приготування контролю замість гомогенату брали 2 мл дистильованої води. Викликану флуоресценцію визначали за допомогою відповідних фільтрів.

Після вимірювань флавіни відновлювали, додаючи 0,01 мл 10% розчину NaHSO₃ у 5% NaHCO₃. Залишкова не флавінова флуоресценція зазвичай була виражена; її віднімали від отриманих величин. Концентрація ФАД у кожній пробірці дорівнює (А₂–А₁)/0,85. Коефіцієнт 0,85 уведений тому, що інтенсивність флуоресценції ФАД складає лише 15% інтенсивності флуоресценції рибофлавіну. Порівняння з аналогічно обробленим стандартом рибофлавіну дає вміст ФАД за рибофлавіном. А₂ – еквівалент загальної кількості флавінів. Загальні флавіни, за винятком ФАД, – вміст вільного рибофлавіну разом із ФМН (далі позначається як фракція РФ + ФМН). Для порівняння результатів досліджень розраховували середнє арифметичне (М) та середньоквадратичне відхилення (SD).

Результати та їх обговорення

Визначаючи вміст загальних флавінів за умов трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів, установили, що трансплантація не впливає на цей показник (табл. 1). Для порівняння впливу трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів проведено операції без підсадки. У цьому випадку не спостерігалось достовірних змін концентрації загальних флавінів відносно контролю.

У таблиці 2 наведено результати визначення кількості РФ + ФМН у випадку трансплантації м'язових тканин в одноплідних щурів та в разі операції без підсадки. Можна відмітити достовірне зменшення показників відносно контролю у стегнової м'язової тканині донора на третю добу дослідження. У черевній м'язовій тканині реципієнта достовірних змін кількості РФ + ФМН відносно контролю не відбувається. Досліджуючи вплив операції без підсадки м'язової тканини, спостерігали достовірне зменшення РФ + ФМН на третю добу дослідження як у стегнової, так і в черевній м'язовій тканині.

Таблиця 1

Концентрація загальних флавінів за умов підсадки тканини одноплідних щурів та без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	11,1 ± 1,2	10,3 ± 2,2	11,2 ± 1,1	13,3 ± 3,2
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	11,1 ± 1,2	12,1 ± 1,3	15,2 ± 2,3	13,3 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина донора	10,2 ± 2,1	10,4 ± 2,2	11,2 ± 1,2	11,2 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина реципієнта	10,2 ± 2,1	11,1 ± 1,3	10,1 ± 1,0	12,2 ± 4,1
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	11,1 ± 1,2	9,2 ± 3,1	9,2 ± 1,3	14,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина	10,2 ± 2,1	12,2 ± 3,1	6,1 ± 1,2	16,3 ± 7,2*

Примітка: * – достовірні відмінності відносно контролю, P < 0,05.

Таблиця 2

Кількість РФ + ФМН за умов підсадки тканини одноплідних щурів і без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	10,1 ± 1,3	7,1 ± 1,3*	5,2 ± 1,2*	9,3 ± 2,1
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	10,1 ± 1,3	8,1 ± 2,2	8,2 ± 2,2	7,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина донора	11,2 ± 2,3	4,1 ± 1,3	7,1 ± 1,3	7,2 ± 2,2
	Черевна м'язова тканина реципієнта	11,2 ± 2,3	5,2 ± 1,4*	6,2 ± 1,1*	6,3 ± 1,2*
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	10,1 ± 1,3	6,2 ± 2,2	5,2 ± 1,3*	9,2 ± 1,2
	Черевна м'язова тканина	11,2 ± 2,3	11,3 ± 4,2	3,4 ± 1,2*	10,2 ± 7,2

Примітка: див. табл. 1.

У таблиці 3 наведено результати визначення кількості ФАД у разі трансплантації м'язових тканин у щурів одного посліду та впливу операції без підсадки м'язової тканини на кількість ФАД. Кількість ФАД у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта достовірно збільшувалась відносно контролю на третю добу дослідження. У черевній м'язовій тканині донора та

реципієнта достовірних змін не спостерігалось. За умов операції без підсадки спостерігається достовірне збільшення концентрації ФАД у стегновій м'язовій тканині відносно контролю лише на сьому добу дослідження. У черевній м'язовій тканині на третю добу дослідження відбувалося достовірне зменшення концентрації ФАД відносно контрольного показника.

Таблиця 3

Кількість ФАД за умов підсадки тканини одноплідних щурів і без підсадки (мМ/г тканини, M ± SD, n = 6)

Вид операції	Вид скелетної м'язової тканини	Контроль (без підсадки)	Перша доба	Третя доба	Сьома доба
Підсадка тканини одноплідних щурів	Стегнова м'язова тканина донора	4,1 ± 1,3	4,1 ± 1,2	7,2 ± 1,3*	5,2 ± 2,3
	Стегнова м'язова тканина реципієнта	4,1 ± 1,3	5,2 ± 1,3	9,2 ± 2,1*	7,2 ± 2,1
	Черевна м'язова тканина донора	7,2 ± 2,1	7,3 ± 1,3	5,3 ± 1,2	5,2 ± 2,3
	Черевна м'язова тканина реципієнта	7,2 ± 2,1	7,3 ± 1,2	7,2 ± 1,1	7,3 ± 1,2
Без підсадки	Стегнова м'язова тканина	4,1 ± 1,3	6,2 ± 2,2	5,2 ± 1,3	9,4 ± 1,2*
	Черевна м'язова тканина	7,2 ± 2,1	8,3 ± 2,1	2,2 ± 0,4	7,2 ± 1,3

Примітка: див. табл. 1.

Обмінні перетворення рибофлавіну у тканинах тварин і клітинах мікроорганізмів включають реакції, що викликають синтез і подальший розпад ФМН і ФАД (Ochoa, 1939). Рибофлавін також бере участь у різних метаболічних окисно-відновних реакціях, метаболізмі одновуглецевих сполук, які являють собою мережу взаємопов'язаних біохімічних шляхів, генерують одновуглецеві групи, необхідні для фізіологічних процесів (Ziegler, 2007). Порушення одного метаболізму вуглецю може перешкодити реплікації, репарації ДНК і регуляції експресії генів за допомогою метилювання, що може спричинити канцерогенез (Kim, 2004). Дефіцит рибофлавіну відіграє важливу роль у прогресуванні різних видів раку, а також підвищенні вразливості клітин до раку (Webster, 1996). Крім того, він бере участь у підвищенні активності багатьох протипухлинних препаратів, а також активації імунної системи. Питання

транспорту рибофлавіну та його похідних в організмі тварин досліджені недостатньо.

Висновки

Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів не викликає достовірних змін кількості загальних флавінів. За умов трансплантації м'язових тканин одноплідних щурів уміст РФ + ФМН у стегновій м'язовій тканині донора та черевній м'язовій тканині реципієнта на третю добу дослідження достовірно зменшується відносно контролю. Трансплантація м'язових тканин одноплідних щурів зумовлює збільшення концентрації ФАД у стегновій м'язовій тканині донора та реципієнта на третю добу експерименту. Таким чином, трансплантація стегнової м'язової

тканини одноплідних щурів сприяє прискоренню синтезу ФАД із рибофлавіну та ФМН.

Бібліографічні посилання

- Danilov, R.K., 2007. Gistologija. Jembriologija. Citologija [Histology. Embryology. Cytology]. Medicine, Moscow (in Russian).
- Kim, Y.I., 2004. Folate and DNA methylation. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, 511–519.
- Kuznecov, S.L., 2001. Skeletnye myshci. Rukovodstvo po gistologii [Skeletal muscles. Guide to histology]. SpecLit, SPb (in Russian).
- Lebedeva, N.B., 1992. Strukturno-biohimicheskie osnovy sokratitel'nyh svojstv razlichnyh tipov skeletnyh myshechnykh volokon [Structure-biochemical bases of properties of various types of skeletal muscle fibers]. Morfologija 102(4), 122–133 (in Russian).
- Ochoa, S., Rossiter, R.J., 1939. Flavin-adeninedinucleotide in rat tissues. Biochem. J. 33(12), 2008–2016.
- Rokitskij, P.F., 1967. Biologicheskaja statistika [Biological statistics]. Vysshaja Shkola, Minsk (in Russian).
- Judenfreund, S., 1969. Fluoriscentnye metody v biologii i medicine [Fluorescent methods in biology and medicine]. Mir, Moscow (in Russian).
- Shubnikova, E.A., 2001. Myshechnye tkani [Muscular tissue]. Medicina, Moscow (in Russian).
- Shpichka, A.I., Semenova, E.F., Kuznetsova, A.V., 2011. K voprosu opredelenija riboflavina v biotekhnologicheskom syr'e [On the determination of riboflavin in biotechnological materials]. Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniia 1, 30–32 (in Russian).
- Shinagawa, T., 1956. Influences of the overdose of thiamine on the urinary excretion of pyridoxine and riboflavine. Vitamin (Kyoto) 11, 467–469.
- Webster, R.P., Gawde, M.D., Bhattacharya, R.K., 1996. Modulation of carcinogen induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. Cancer Lett. 98, 129–135.
- Ziegler, R.G., Lim, U., 2007. One-carbon metabolism, colorectal carcinogenesis, chemoprevention – with caution. J. Natl. Cancer. Inst. 99(16), 1214–1215.

Надійшла до редколегії 28.01.2015