

Fedorko N. L., Petrov S. S., Nikolaienko K. V. The content of riboflavin and its coenzymes forms in the brain of rats of different ages. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(7):800-812. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.844093>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4707>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7
© The Authors 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 01.07.2017. Revised: 02.07.2017. Accepted: 31.07.2017.

THE CONTENT OF RIBOFLAVIN AND ITS COENZYMES FORMS IN THE BRAIN OF RATS OF DIFFERENT AGES

N. L. Fedorko, S. S. Petrov, K. V. Nikolaienko

Odessa I. I. Mechnikov National University

Pro.Shampansky, 2, Odessa, Ukraine

E-mail: nataliafedorko.biochemistry@gmail.com

Abstract

The content of total riboflavin and its coenzymes (FAD and FMN) in the brain homogenates of rats of different ages by means of fluorimetric ion exchange chromatography was determined. The experiment included 3 age groups of rats: 3 months, 10-12 months, and the old 22-24 months.

The dependence of the content of riboflavin and its coenzymes in the cortex, brain stem, cerebellum and large hemispheres from the age of experimental rats was established. The decrease in the content of riboflavin coenzymes in the brain of adult rats and their partial increase in the elderly rats confirms the presence of riboflavin hypovitaminosis, mitochondrial dysmutation and free radical oxidation in the process of aging, and also facilitates the mobilization of adaptive mechanisms aimed at increasing the life span and preserving adaptation to the environment in old animals.

Key words: riboflavin, flavinadenin dinucleotide (FAD), flavin mononucleotide (FMN), rat, aging, brain, trunk, bark, large hemisphere, cerebellum.

ВМІСТ РИБОФЛАВІНУ ТА ЙОГО КОФЕРМЕНТНИХ ФОРМ В МОЗКУ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Н. Л. Федорко, С. С. Петров, К. В. Ніколаєнко

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова

Пров.Шампанський,2, Одеса, Україна

e-mail: nataliafedorko.biochemistry@gmail.com

Реферат

Визначено вміст загального рибофлавіну та його коферментів (ФАД та ФМН) у гомогенатах відділів мозку щурів різного віку за допомогою іонообмінної хроматографії флуориметричним методом. У дослід було включено 3 вікові групи щурів: 3 місяця, 10-12 місяців і старі 22-24 місяця.

Встановлена залежність вмісту рибофлавіну та його коферментів у корі, стовбурі головного мозку, мозочку та великих півкулях від віку дослідних щурів. Зменшення вмісту коферментів рибофлавіну у відділах головного мозку дорослих щурів, та частково збільшення їх вмісту у старих щурів підтверджує наявність гіповітамінозу рибофлавіну, мітохондріальної дисмутації та вільнорадикального окиснення у процесі старіння, а також сприяє мобілізації адаптивних механізмів, спрямованих на збільшення періоду життя та збереження адаптацій до середовища у старих тварин.

Ключові слова: рибофлавін, флавінаденідинуклеотид (ФАД) , флавінмононуклеотид (ФМН), щури, старіння, мозок, стовбур, кора, великі півкулі, мозочок.

ВСТУП. Розвиток структури і функції мозку в еволюції став одним з найважливіших адаптивних механізмів, спрямованих на збільшення життєздатності організму, зміни темпу процесу старіння. Передбачається, що завдяки діяльності мозку в ході старіння мобілізуються адаптивні механізми, спрямовані на збільшення періоду життя, збереження адаптації до середовища. В той же час вікові зміни ЦНС - один із важелів механізму старіння. По-перше, нейрони є постмітотичними,

високоспеціалізованими, не здатними до поділу клітинами; тривалість їх життя дорівнює тривалості життя усього організму. По-друге, зміни в метаболізмі, структурі і функції ЦНС призводять до істотних порушень в діяльності ряду органів і систем, до зменшення пристосувальних можливостей старіючого організму. 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.

Враховуючі існуючі дослідження, не до кінця зрозумілим залишається метаболізм рибофлавіну в тканинах та органах в онтогенезі.

МЕТА ТА ЗАВДАННЯ ДОСЛІДЖЕННЯ. Метою роботи було визначення особливості вмісту рибофлавіну та його коферментних форм у різних відділах мозку щурів різного віку.

Для досягнення поставленої мети було визначено наступні завдання:

1. Визначити вміст загального рибофлавіну та його коферментів в корі, стовбурі головного мозку, мозочку та великих півкулях щурів різного віку методом колонкової іонообмінної хроматографії.

2. Оцінити процес метаболізму рибофлавіну у відділах мозку щурів в геронтогенезі.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. В організмі людини РФ інтенсифікує процеси обміну речовин в організмі, беручи участь у метаболізмі білків, жирів і вуглеводів [1]. Основна користь, яку приносить вітамін В₂, полягає в отриманні енергії за участю коферментів ФМН і ФАД. Деякі факти вказують на те, що уповільнений метаболізм кисню в мітохондріях клітин мозку може мати значення в патології мігренових головних болів. Тоді як початкова складова двох флавінових коферментів (ФАД і ФМН), необхідна для утворення флавопротеїнів в ланцюзі транспорту електронів в мітохондріях, додатковий рибофлавін розглядався дослідниками, в якості засобу для лікування мігрени [2].

При рибофлавіновій недостатності в експерименті виявлені функціональні і морфологічні зміни в центральній та вегетативній нервовій системі, а тривале введення рибофлавіну в дозах, що перевищують фізіологічну потребу організму, може мати несприятливий вплив на нервову систему [1, 2].

Існує прямий зв'язок між ступенем недостатності рибофлавіну у тварин і накопиченням в крові продуктів ПОЛ, розвитком атеросклерозу і катаракти. Ці порушення, на думку авторів, вказують на важливу роль флавопротеїнів в

молекулярних механізмах синтезу і розпаду продуктів ПОЛ. Однак, подібні зміни були відсутні в мозку при старінні, і це може бути в якійсь мірі пов'язано з високою активністю низкомолекулярних антиоксидантів, оскільки загальна антиокисна активність в мозку старих щурів не змінювалася [3-5].

Флавіновмісні ферменти каталізують багато реакцій біологічного окислення, які сповільнюються з віком. Однією з найбільш відомих за останні роки фундаментальних теорій в геронтології є вільнорадикальна теорія старіння Д.Хармана. Відповідно до цієї теорії, продукуємі при диханні, а також багатьох ферментативних метаболічних реакцій в організмі, такі молекули як супероксид ($O_2\cdot^-$), H_2O_2 , гідроксильний радикал (ОН) і, можливо, синглетний кисень (O_2) порушують клітинні макромолекули (ДНК, білки, ліпіди), що приводить до мутацій, нестабільності геному в цілому і, внаслідок цього, до старіння організму і розвитку цілого ряду пов'язаних з віком патологічних процесів, включаючи дисфункції мозку, катаракту і деякі інші [6, 7].

Завдяки дослідженню Ogunleye та Odutuga (1989) стало відомо, що після дієти, позбавленої рибофлавіну, маса їх мозку стала на 19,8 % менша за масу мозку інтактних тварин. До такої редукції мозкової тканини призвело зниження рівню мієлінових ліпідів, церебросидів та сфінгомієліну, які як і фосфатидилетаноламін є найважливішими компонентами мієлінової мембрани. Таким чином була доведена роль рибофлавіну на стан мозку щурів [8]. Також, роль рибофлавіну в раціоні тварин була розглянута Foy і Mbaaya [9].

Відсутність РФ проявляється спочатку затримкою, а потім і повним припиненням росту щурів. Дефіцит РФ впливає на вміст ліпідів в таких органах, як печінка, нирки і наднирники. Це пов'язано тим, що з РФ є невід'ємною частиною протетичної групи арил-КоА-дегідрогенази (ферменту, важливого для В-окислення жирних кислот).

Також, треба приймати до уваги роль, яку відіграє ФАД у складі мітохондрій. Саме в клітинах мозку, печінки та скелетної і серцевої мускулатури міститься найбільша кількість мітохондрій, кількість яких контролює енергетичні потреби клітин [10].

З тих пір як в 1960-х роках вперше були описані мітохондріальні захворювання, було докладено багато зусиль до розуміння значення мітохондрій в процесах норми, патології та старіння. В даний час відомо, що широкий діапазон на вигляд не пов'язаних захворювань, від шизофренії до діабету, мають у своїй основі загальні

патологічні механізми, а саме мітохондріальну дисфункцію, утворення РФК і накопичення пошкоджень в мтДНК [11, 12].

Таким чином, враховуючи те, що дисфункція мітохондрій призводить до загибелі нейронів, можна прийти до висновку, що зменшення вмісту ФАД у мозку щурів буде призводити до загибелі нейронів, зменшення маси мозку, і ці процеси будуть посилюватись із віком щурів. Такі міркування підтверджує ряд досліджень Lesclerc J. та інших, які показали що у старих щурів зменшення рівня ФАД може досягати 50 % [13-15].

Враховуючи, що метаболізм вітаміну В₂ та його коферментних форм у різних відділах мозку щурів різного віку ще недостатньо вивчений, саме цей напрям досліджень привернув нашу увагу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження було включено 3 вікові групи щурів: молоді (3 місяця) вагою 100-120 г, статевозрілі (10-12 місяців) вагою 200-220 г і старі (22-24 місяця) 350-450 г. В кожній групі було по 8 щурів.

Всі маніпуляції з тваринами проводили згідно до Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних наукових цілей [16].

Матеріалом дослідження була тканина мозку. З мозку виділяли великі півкулі, мозочок, стовбур, кору и визначали вміст рибофлавіну, ФАД, ФМН.

Отримані результати досліджень обробляли загальноприйнятим статистичним методом. Результати вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

Методи дослідження.

Екстракція флавінів з тканин щурів

Кожну наважку тканин подрібнювали ножицями у скляному гомогенізаторі, додавали 4 мл води, попередньо нагрітої до 80°C і витримували на водяній бані при цій температурі протягом 5 хвилин.

Потім подрібнені тканини гомогенізували і отриману суспензію кількісно переносили в градуйовану центробіжну пробірку, розводячи гарячою водою до 20 мл, і нагріваючи при 80°C протягом ще 15 хвилин, періодично помішуючи.

Після охолодження до кімнатної температури суспензію доводили водою до 20 мл, перемішували і центрифугували 10 хв. при 3000g. Для подальшого аналізу використовували супернатант.

Колонкова іонообмінна хроматографія. На поверхню колонки з ДЕАЕ-целюлозою наносили свідки (В₂, ФАД, ФМН) та гомогенат тканини в відповідній

кількості: по 2 мкг розчинених в 1 мл 0,6 % H_3PO_4 і 2 мл гомогенату. Елюцію проводили 0,6 % H_3PO_4 , швидкість флотації була 5 мл за 5 хв. Кожну пробу виміряли на флуориметрі.

Визначення флавінів флуориметричним методом. Принцип методу флуориметрії полягає в пропорційності між інтенсивністю фотолюмінесценції аналізованого зразка і кількістю визначаємої речовини. Для визначення флавінів та їх похідних, кожену фракцію вимірювали на флуориметрі при довжині хвилі 520 нм. проти відповідних стандартів та світофільтрів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст рибофлавіну та його коферментних форм у мозку щурів 3-х місячного віку. Отримані дані представлені на рис. 1. Найбільший вміст загального рибофлавіну (РФ) спостерігається у корі та стовбурі, що майже у 2 рази перевищує його вміст у мозочку та великих півкулях мозку 3-х місячних щурів

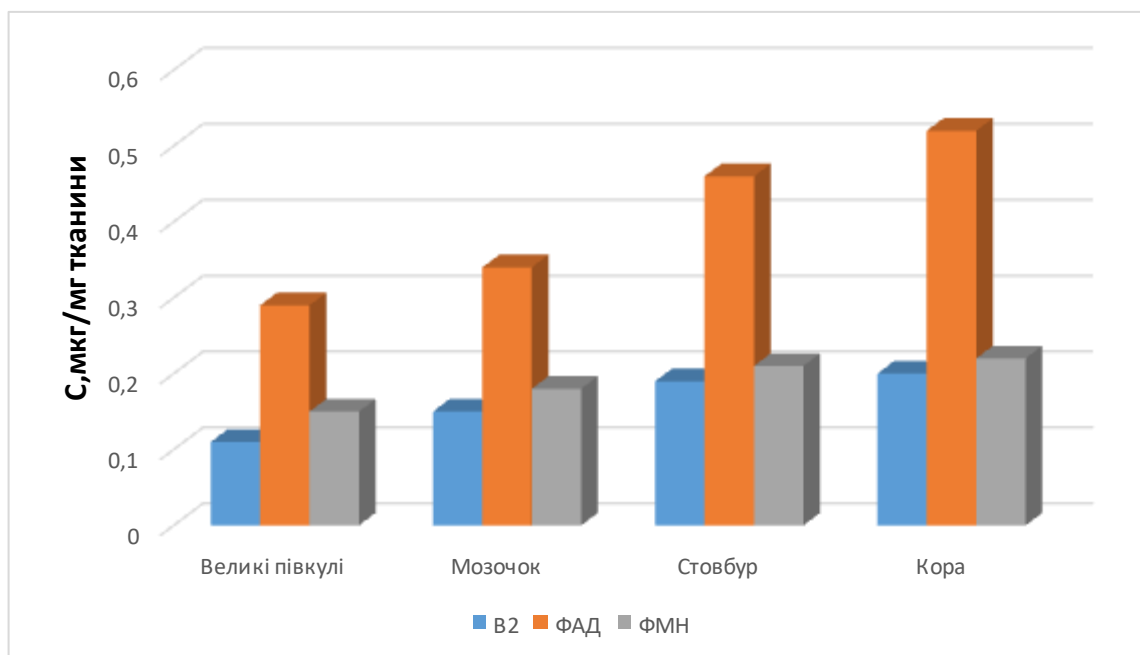


Рис.1. Вміст флавінів у відділах головного мозку 3-х місячних щурів ((n=8)

Враховуючи, що саме у корі знаходиться зоровий центр, а функціями стовбура є регуляція всіх рефлексів очей, а також контроль зіниці та рещічатого м'яза, можна припустити, що дійсно має місце залежність між вмістом загального РФ та можливістю виникнення катаракти ока, та інших захворювань ока. Крім того, кора головного мозку щурів в цьому віці має відносно максимальні розміри. Саме завдяки ній, щури здатні орієнтуватися в просторі, запам'ятовувати місця в яких побували та прогнозувати події.

У всіх відділах мозку найбільша концентрація відповідає саме ФАД, при цьому його максимальна концентрація досягається саме у корі, що також узгоджується з літературними даними [15]. У корі вміст ФАД на 33 % перевищує вміст В₂, та на 58 % перевищує вміст ФМН.

Враховуючи високий рівень вмісту ФАД у корі головного мозку, можна припустити, що у цьому віці у щурів процеси вільнорадикального окиснення протікають відносно швидко, що стверджує про те, що в віці 3-х місяців можна спостерігати максимальні процеси енергетичного обміну в її клітинах, ріст тварини, статеве дозрівання та дорослішання.

Рівень ФМН також максимальний у корі та стовбурі головного мозку. Менше його у мозочку та великих півкулях відповідно.

Таким чином, розподіл рибофлавіну та його коферментів у різних відділах головного мозку 3-х місячних щурів нерівномірний.

Вміст рибофлавіну та його коферментних форм у мозку щурів 12-ти місячного віку. Вміст загального РФ для однорічних щурів максимальний у корі головного мозку – 0,7 мкг/ мг тканини, трохи менше його у стовбурі – 0,68 мкг/ мг. Значно поступаються по вмісту РФ мозочок та великі півкулі – 0,51 та 0,38 мкг/мг тканини, що на 27% та 45% менше за його вмісту в корі, відповідно (рис.2).

Вміст В₂, так само як і у 3-х місячних щурів максимальний у корі та стовбурі головного мозку та мінімальний у великих півкулях. Цю ж закономірність можна прослідкувати для ФАД та ФМН.

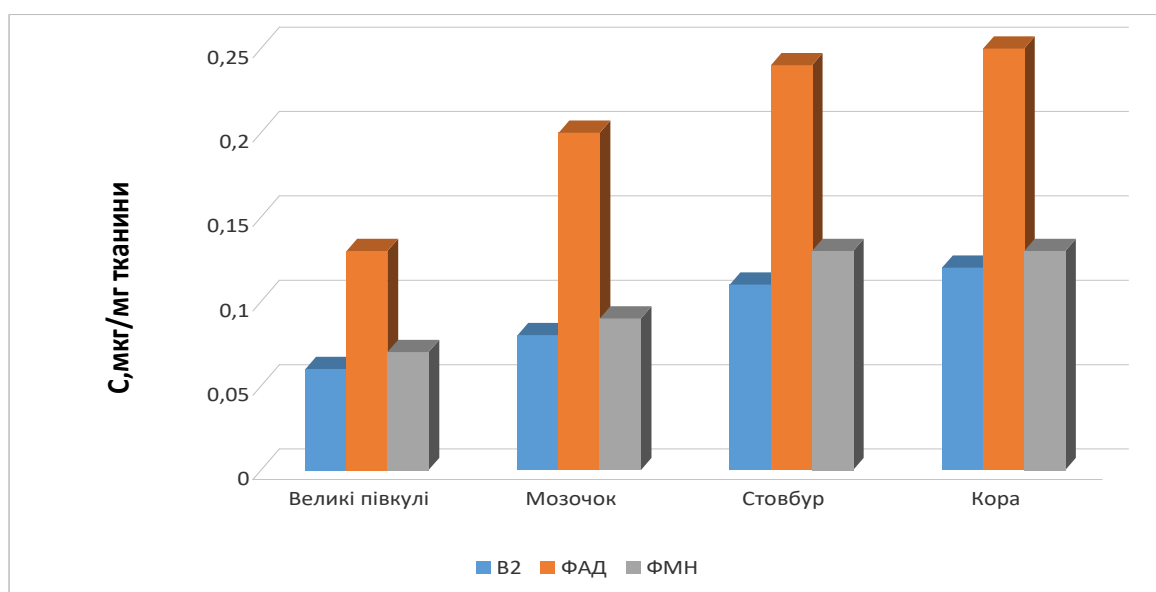


Рис. 2. Вміст флавінів в відділах головного мозку 12-ти місячних щурів (n=8)

Таким чином, відзначено, що вік щурів не впливає на розподіл загального РФ та його компонентів у різних відділах головного мозку, але якщо порівнювати отримані дані для однорічних щурів із даними 3-х місячних щурів можна побачити, що вміст загального РФ, а особливо ФАД із віком зменшується у всіх відділах.

Рівень В₂ у однорічних щурів в порівнянні із 3-х місячними зменшився на 18% у корі, на 22,5% - у стовбурі, на 2,4% в мозочку та на 10% у великих півкулях. Рівень ФАД зменшився на 52% у корі, на 48% у стовбурі та на 41% у мозочку і великих півкулях. Вміст ФМН зменшився на 41% у корі, на 38% у стовбурі, на 50% та 53 % відповідно у мозочку і великих півкулях. Враховуючи, що ФАД утворюється з ФМН, такі значні зменшення вмісту ФМН призвели до низького рівню ФАД у мозку більш дорослих щурів. Це можна пояснити тим, що з віком у зв'язку із станом судин зменшується печінково-кишкова рециркуляція вітаміну В₂, саме тому ми спостерігали зменшення рівня ФАД у всіх відділах головного мозку.

Цікаво, що з віком не змінилось співвідношення загального РФ та його компонентів, але відбулося помітне зменшення їх вмісту у відсотках.

Одержані дані підтверджують міркування про те, що зменшення вмісту ФАД у мозку щурів можуть призводити до дисфункції мітохондрій, та як результат – до загибелі нейронів та зменшення маси мозку. Також, якщо спиратися на попередніх дослідженнях, таке зменшення вмісту РФ має призводити до накопичення в крові продуктів ПОЛ, розвитку атеросклерозу і катаракти [8].

Можна припустити, що при старінні має місце редукція мозкової тканини, яка пов'язана зі зниженням рівня мієлінових ліпідів, цереброзидів та сфінгомієліну, крім того в мозковій тканині буде підвищуватись рівень дієнових кон'югатів та малонового діальдегіду, як продуктів вільнорадикального окиснення.

Для того, щоб підтвердити чи спростувати такі міркування був проведений аналогічний ряд досліджень на старих 24-х місячних щурах.

Вміст рибофлавіну та його коферментних форм у мозку щурів 24-х місячного віку. Дані досліджень представлені на рис. 3 і підтверджують, що вік щурів не впливає на розподіл РФ у відділах мозку, також зберігаються співвідношення вмісту компонентів загального РФ, але вміст ФАД у всіх відділах головного мозку був найбільший у порівнянні з іншими флавінами. При порівнянні вмісту загального РФ та його компонентів у старих щурів з дорослими та молодими відзначені відмінності у корі головного мозку. Так, вміст ФАД у корі збільшився на 24 % у порівнянні з дорослими щурами, але є на 36,5 % меншим за такий у молодих щурів. Збільшення

вмісту ФАД спостерігається у всіх відділах головного мозку, проте вміст загального рибофлавіну у відділах мозку старих щурів став меншим ніж у дорослих та молодих.

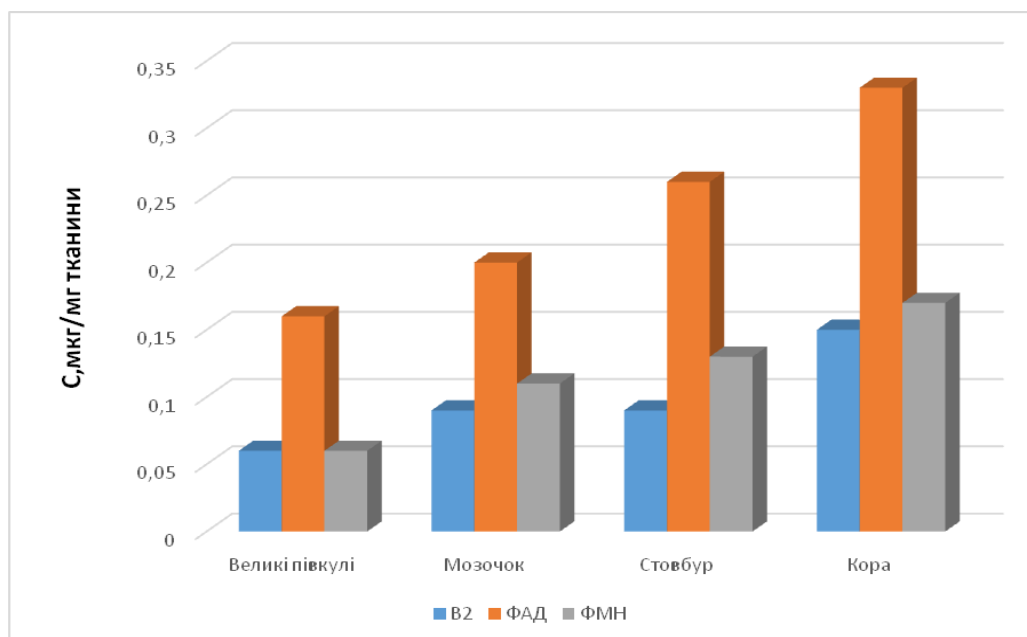


Рис.3. Вміст флавінів в відділах головного мозку 24-х місячних щурів (n=8)

Вміст ФМН у стовбурі головного мозку старих щурів залишався незмінним, але відзначене зменшення рівня ФМН у великих півкулях мозку склало 14%, у мозочку рівень ФМН навпаки трохи збільшився – на 18%, також збільшення його вмісту спостерігалось в корі – 23,5 %.

Рівень B_2 зменшувався у всіх відділах як у порівнянні з молодими, так із дорослими тваринами. У корі ця зміна склала 39% та 22% відповідно; у стовбурі – 57,5% та 45%; в мозочку - 50% та 32%; у великих півкулях – 85% та 83% (рис.1, 2, 3). Ці дані узгоджуються з літературними відомостями, щодо проявів недостатності вітаміну B_2 при старінні [4-7].

Аналізуючи отримані дані можна скласти припущення, що мітохондрії (основний споживач кисню клітин) старих тварин значно не відрізняються від таких у молодих по генерації супероксидного радикала, хоча відзначена структурна і функціональна неоднорідність мітохондрій старих тварин, що призводить до значних розбіжностей в результатах досліджень і тенденція до підвищення генерації АФК мітохондріями старих тварин все ж має місце [7]. Окрім того, отримані дані підтверджують літературні відомості, щодо активації синтезу синтази оксиду азоту при старінні, кофакторами якої є ФАД та ФМН [5].

Також, передбачається, що завдяки діяльності мозку в ході старіння мобілізуються адаптивні механізми, спрямовані на збільшення періоду життя та збереження адаптації до середовища, що також може бути причиною незначного збільшення рівня ФАД та ФМН у старих щурів в порівнянні з однорічними.

Таким чином, розподіл флавінів в тканинах мозку щурів не залежив від віку, але вміст флавінів та їх співвідношення змінювались в геронтогенезі.

Найбільші показники, щодо вмісту РФ та його коферментних форм були притаманні молодим щурам. Саме в цьому віці активність всіх систем органів та окисних процесів максимальна. З досягненням щурами одного року всі флавіни в мозкових тканинах мали тенденцію до зменшення. Таке пригнічення вмісту рибофлавіну та його коферментів може свідчити про процес зупинки росту, та сповільнення всіх процесів в організмі.

Однак, при порівнянні вмісту РФ та його коферментів у старих щурів з дорослими та молодими помітні відмінності. Відзначено збільшення рівня ФАД у всіх досліджуваних відділах мозку, проте вміст рибофлавіну у відділах мозку старих щурів став меншим ніж у дорослих та молодих. Рівень ФМН майже не змінювався у порівнянні з дорослими щурами. Результати нашого дослідження можуть бути використанні для пояснення механізмів старіння.

ВИСНОВКИ

1. Вміст загального рибофлавіну та його коферментів у досліджуваних відділах головного мозку були найбільшими у 3-х місячних щурів.

2. Співвідношення рибофлавіну та його коферментів у досліджуваних відділах мозку зберігається як для молодих щурів, так і для дорослих та старих тварин.

3. Встановлено, що максимальний рівень ФАД у щурів різного віку знаходиться у корі та стовбурі головного мозку.

4. Вміст флавінів зменшується у всіх відділах головного мозку і найбільше у корі при досягненні дорослого віку щурів.

5. При досягненні 2-х річного віку вміст флавінів у досліджуваних відділах мозку вибірково починає збільшуватись, але не досягаючи даних 3-х місячних тварин, що може бути пояснено мобілізацією адаптивних механізмів, спрямованих на збільшення періоду життя та збереження адаптації до середовища.

ЛІТЕРАТУРА

1. Helen B. Burch, Effects of riboflavin deficiency and realimentation on flavin enzymes of tissues // JBC. 1956. – P. 29-45

2. Boehnke C., Reuter U., Flach U., Schuh-Hofer S., Einhüpl 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.

3. 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.

4. 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.

5. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. — СПб.: Наука, 2003. — 468 с.

6. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах// *Сорос, образоват. журнал.* – 2000.- № 12. – С. 13-19.

7. Кольтовер, В.К. Свободнорадикальная теория старения: -исторический очерк // *Успехи геронтологии.* - 2000.-Вып. 4.- С. 33-40.

8. 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.

9. 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.

10. Ames, B.N. Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases // *Mech Ageing Dev.* 2010. V. 131.-№7-8.- P. 473-479.

11. Константинов Ю.М. Дисфункция митохондрий при нейродегенеративных заболеваниях // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* – 2010. - № 5 – С. 87-91.

12. Morterá 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

Reference

1. Helen B. Burch, Effects of riboflavin deficiency and realimentation on flavin enzymes of tissues // *JBC*. 1956. – P. 29-45

2. 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.

3. Arutunyan A.V. Mexanizmi svobodnoradikalnogo okisleniya i ego rol v starenii Tekst./ A.V. Arutunyan, L.S. Kozina // *Uspehi gerontologii*, 2009. - №1 - P. 104-116.

4. Kolesnichenko E.V. Issledovanie perekisnogo okisleniya lipidov I urovnya mozgovogo neirotroficheskogo faktora u bolnix chizofreniei // *Nevrologicheski vestnik*. 2008. - T. XL. – vip. 3. - P. 47 - 50.

5. Anisimov V.N. Molekulyarnie i fiziologicheskie mehanizmi stareniya.— SPb.: Nauka, 2003. — 468 p.

6. Vladimirov U.A. Svobodnie radikali v biologicheskikh sistemach // *Soros, obrazovat. gurnal.* – 2000. - № 12. – P. 13-19.

7. Koltover V.K. Svobodnoradikalnaya teoriya stareniya: - istoricheskii ocherk // *Uspehi gerontologii* - 2000. - vip. 4. - P. 33-40.

8. Ogunleye A.J., Odotuga 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.

9. 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.

10. Ames B.N. Optimal micronutrients delay mitochondrial decay and age-associated diseases // *Mech Ageing Dev*. 2010. V. 131. - №7-8. - P. 473-479.

11. Konstantinov U.M. Disfunktsiya mitochondrii pri neurodegenerativnich zabolevaniyach // *Gurnal nevrologii I psichiatrii im. S.S. Korsakova*. – 2010. - № 5 – P. 87-91.

12. Morterá 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

16. 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.