

МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. В.П. Астафьева

(КГПУ им. В.П. Астафьева)

Факультет биологии, географии и химии

Выпускающая кафедра биологии, химии и экологии

Наточий Ирина Олеговна

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

**ПРОЕКТ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ
СТАРШЕКЛАССНИКА «БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
СТАРЕНИЯ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ»**

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями)

Направленность (профиль) образовательной программы Биология и химия

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой д.б.н., профессор Антипова Е.М.

Руководитель к.б.н., доцент Елсукова Е.И.

Дата защиты _____

Обучающийся Наточий И.О.

Оценка _____

Красноярск, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
1.2.2. Бурый адипоцит.....	13
1.2.3. Бежевый адипоцит	16
1.3. Онтогенетическая динамика метаболических и функциональных свойств жировых тканей.....	17
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ ЭНЕРГООБМЕНА.....	22
2.1. Объект и методы исследований.....	22
2.1.3. Определение относительной экспрессии белка UCP1 в жировых тканях с помощью вестерн-блоттинга.....	25
2.2 Экспериментальные результаты.....	28
ГЛАВА 3 ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ОРГАНИЗАЦИЯ НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ 10-11 КЛАССОВ	33
3.1. Общие принципы организации НИР школьников в лаборатории биохимии и физиологии	33
3.2.Этапы работы с обучающимися	36
3.3. Организационно-методические документы к научно-исследовательскому проекту обучающихся.....	40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47
ПРИЛОЖЕНИЕ	53
Приложение А	53
Приложение Б	55
Приложение В.....	56
Приложение Г	57

ВВЕДЕНИЕ

В современных реалиях жизни Российской Федерации, когда она находится под колоссальным санкционным давлением, как никогда требуется развитие и внедрение инновационных научно-исследовательских проектов. Согласно Федеральному Закону Об Образовании РФ, к числу требований предметных результатов относят усиление акцентов на изучение современного состояния науки в России и в мире в целом. Образование, являющееся единым целенаправленным процессом воспитания и обучения, призвано способствовать формированию знаний, умений, навыков и компетенций, имеющих цели интеллектуального и (или) профессионального развития человека¹.

Последние несколько лет наблюдается тенденция комплексных изменений системы образования, основная цель которых – повышение активной роли обучающегося как субъекта образовательного процесса. Фокус деятельности учителя, при этом, смещается в сторону мотивации и организации познания, педагог становится, прежде всего, наставником и сопровождающим. Привлечение к научно-исследовательской деятельности участников образовательного процесса, в этой модели современного образования, становится чрезвычайно актуальной задачей [Замкин П.В., 2020].

Примерная основная образовательная программа² основного общего образования предусматривает изучение предмета Биология на базовом и углубленном уровнях с 7 по 9, и с 10 по 11 классы. Учебный процесс в специализированных естественнонаучных классах, выбор тематики и работа над обязательным при углубленном изучении предмета научно-

¹Федеральный закон «Об образовании в Российской Федерации» от 29.12.2012 N 273-ФЗ (ред. 07.10.2022)

²«Примерная основная образовательная программа начального общего образования» (одобрена решением Федерального учебно-методического объединения по общему образованию, протокол от 15.09.2022 N 6/22)

исследовательским проектом позволяет выявить среди обучающихся тех ребят, которые проявляют интерес к фундаментальной науке и обеспечить им более серьезное научно-методическое сопровождение со стороны научных лабораторий вузов, технопарков-кванториумов. Актуальность этой работы определяется возросшей ролью современной биологической науки в развитии общества, необходимостью постоянного притока в нее молодых кадров.

Лаборатория физиологии и энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева на протяжении нескольких лет предоставляет возможность выполнения исследовательских проектов для старшеклассников, имеет успешный опыт наставничества и сопровождения. Направление научной деятельности лаборатории связано с исследованием жировых тканей млекопитающих при комплексном воздействии температурных и пищевых факторов, а также их развитие и функционирование в онтогенезе. В связи с обнаруженной недавно ключевой ролью бурой, бежевой и белой жировых тканей в энергетическом, температурном, метаболическом гомеостазе исследования их адаптивного потенциала важны для профилактической медицины, патологической физиологии и терапии. В том числе остроактуальными остаются вопросы возрастных изменений жировых тканей и их влияния на процесс старения организма.

Целью квалификационной работы было проектирование научно-исследовательской работы обучающихся 10-11 классов по теме «Биохимические механизмы старения жировых тканей».

Задачи исследования:

1. Подготовить обзор литературы по физиологии и биохимии жировых тканей, экспрессии в них разобщающего белка UCP1 в онтогенезе.

2. Освоить методы определения интегральных показателей метаболической активности жировых тканей, методы оценки экспрессии белка UCP1.
3. Получить предварительные данные по возрастной динамике содержания общего белка, экспрессии белка UCP1 в межлопаточной бурой жировой ткани, в подкожном паховом и окологонадном депо белой жировой ткани самцов мышей ICR
4. На основе полученных результатов разработать тематику индивидуальных НИР, подготовить методические материалы к ним, и провести их апробацию.

Апробация разработанных исследовательских проектов была реализована с привлечением обучающихся 10А класса МБОУ СОШ №62 г. Красноярск Огризковой Дарьи, Теряевой Софии, Климовой Ксении. Работа обучающихся принята к печати в материалах Всероссийской научно-практической конференции «БИОЭКО», г. Красноярск 2023 г.

Бакалавром самостоятельно выполнен поиск и анализ научной литературы. Под руководством научного руководителя автор выпускной квалификационной работы освоила биохимические методы исследования (глюкозо-толерантный и инсулино-толерантный тесты, GOD-POD метод и GPO-POD метод определения концентрации глюкозы и концентрации триглицеридов в сыворотке крови соответственно, метод Лоури, электрофорез в полиакриламидном геле, вестерн-блот). Совместно с научным руководителем сформулированы цель и задачи исследования, разработаны проекты научно-исследовательских работы «Разобщающий белок в бурой жировой ткани и подкожном депо белой жировой ткани мышей разного возраста» и организационные материалы к ней.

Научно-практическая значимость выполненных исследований подтверждается полученными автором сертификатами о прохождении программы стажер-исследователь в КГПУ им. В.П. Астафьева (Приложение

А), сертификатами и дипломами за участие в научных студенческих конференциях, материалами публикаций в сборниках конференций (БИОЭКО и Новосибирск). По результатам исследований подготовлена и статья Якуненко А.В., Елсукова Е.И., Наточий И.О. Динамика разобщающего белка UCP1 в жировых тканях аутбредных мышей ICR в постнатальном онтогенезе - принята к печати в Журнале эволюционной биохимии и физиологии. 2023. Т.59, №4.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Исторический очерк исследований биохимии и физиологии жировой ткани в XX – XXI вв

Жировая ткань (ЖТ) длительное время не привлекала серьезного внимания исследователей. Вплоть до середины XX в. единичные работы были посвящены особенностям цитологии жировых депо при некоторых режимах кормления, при отдельных патологических процессах [Rosen, Spiegelman., 2014]. Импульсом к ее изучению стало переоткрытие гипоталамической железы как особого бурого типа жировой ткани со специализированным аппаратом производства тепла [Медведев, Елсукова, 2002, с.10]. Исследования биохимических механизмов несократительного термогенеза в клетках бурой жировой ткани развивались параллельно с фундаментальными открытиями в молекулярной биоэнергетике. Открытие в бурой жировой ткани белка термогенина (разобщающего белка 1 – UCP1 «uncoupling protein 1») внесло несомненный вклад в фундаментальные исследования механизмов разобщения окислительного фосфорилирования и дыхания [Jezek et al., 2019]. Сравнительно-анатомические и сравнительно-физиологические исследования, выявление бурой жировой ткани в большинстве отрядов млекопитающих положило начало обсуждению вопросов происхождения и роли двух типов жировых тканей в эволюции гомойотермных животных [Cannon, Nedergaard, 2004]. В 80-е гг. открытие адаптивного усиления энергообмена, повышения экспрессии гена разобщающего белка в буром жире лабораторных мышей на рационах с высокими вкусовыми качествами положило начало концепции диет-индуцированного термогенеза (ДИТ) в бурой жировой ткани [Medvedev, Elsukova, 2015]. Ее активному развитию, поискам биохимических механизмов ДИТ на рубеже XX и XXI вв. способствовал быстрый рост частоты алиментарного ожирения в

человеческой популяции. ДИТ стал рассматриваться как природный механизм, препятствующий нарушению энергобаланса при переедании. Развитию этой концепции способствовало открытие в 90-е г лептина – гормонального продукта зрелых белых адипоцитов жировых депо. Лептин угнетает гипоталамические центры пищевого поведения и стимулирует катехоламинергический путь усиления экспрессии разобщающего белка и других термогенно значимых белков в буром жире, представляя своеобразную обратную связь от энергодепонирования к органам энергорассеяния[Friedman, 2019]. Однако результаты экспериментирования с кафетерийными диетами были недостаточно воспроизводимы; лептин, увеличивая термогенный потенциал, не стимулировал в термoneйтральных условиях процесс термогенеза, и представления об эволюционно сформировавшемся механизме против ожирения противоречили экологической и эволюционной биологии [Medvedev, Elsukova, 2015]. Хотя экспериментальные исследования ДИТ зашли в тупик, их результаты помогли сформировать представления о функциональной системе энергообмена на организменном уровне. Ключевым регулируемым звеном этой системы является интенсивность энергообмена, настраиваемая гипоталамусом и гормонами в соответствии с потребностями температурного гомеостаза и достаточностью энергетических субстратов. Жировые депо, депонируют энергосубстраты, поддерживая их гомеостаз во внутренней среде. Бурая жировая ткань не более чем орган факультативного термогенеза, способный в полной мере осуществлять свою функцию только при достаточном уровне накопленной энергии. Сигналами об этом уровне являются лептин, ненасыщенные, полиненасыщенные жирные кислоты и их производные. Рассматривая эти партнерские отношения между двумя типами жировых тканей, профессор Cinti объединил жировые депо и основные скопления бурого жира в единый адипозный орган [Cinti, 2012]. В ходе дальнейших глубоких исследований сигнальных паракринных и эндокринных молекул жировых тканей, внутриклеточных сигнальных

каскадов, транскрипционной регуляции обнаружилась значительная биохимическая, анатомо-морфологическая гетерогенность жировых клеток [Rosen, Spiegelman 2014; Sanchez-Gurmachez J., Guertin D., 2014]. Наряду с жировыми депо единичные или формирующие небольшие скопления белые и буроподобные адипоциты встречаются в костном мозге, в тимусе, в сосудистой стенке, в эпикарде сердца и многих других органах [Elsukova, 2020]. В конце первого десятилетия XXI века обратили внимание на клетки с экспрессией разобщающего белка UCP1, локализованные вне скоплений бурого жира – бежевые адипоциты, на способность этой клеточной популяции быстро изменять численность в жировых депо при разных экспериментальных воздействиях. Современные методы транскриптомики, протеомики, метаболомики, клеточной трассировки доказали, что жировая ткань представлена более чем двумя типами жировых клеток. В настоящее время наряду с классическими белыми и бурыми адипоцитами, бежевыми адипоцитами жировых депо в отдельные типы выделяют розовые адипоциты молочных желез, желтые адипоциты красного костного мозга [Cinti, 2019; Romantsova, 2021]. Хотя функции вновь открываемых типов адипоцитов пока остаются неизвестными, манипуляции с их генетическим удалением приводят к серьезным нарушениям метаболизма на системном уровне [Cohen et al., 2014]. Значительный фундаментальный и практический интерес представляет вопрос о происхождении разнообразия типов адипоцитов. Эксперименты с клеточной трассировкой продемонстрировали серьезные различия в онтогенетическом происхождении белых и бурых адипоцитов. Бурые адипоциты ведут происхождение от общих со скелетной мускулатурой клеток-предшественников, классические белые адипоциты происходят от клеток латеральной мезодермы или от клеток нервного гребня [Parra-Peralbo et al., 2021]. Несмотря на интенсивные исследования бежевого адипогенеза, природа клеточных предшественников и механизмы появления бежевых адипоцитов (трансдифференцировка, дифференцировка *de novo*, периодические переходы клетки между слабодифференцированным и

дифференцированными состояниями) остаются невыясненными [Gasparetal., 2021; Quianetal, 2021]. Еще одно активно развивающееся в настоящее время направление исследований жировой ткани связано с эндокринной функцией ее клеток. Спектр гормонов адипоцитов и их эффектов оказался крайне широким, динамичным, запускающим серьезные адаптивные перестройки других структур организма [Елсукова, Медведев, 2016; Romantsova, 2020].

Таким образом, в настоящее время жировая ткань представляется сложным высокодинамичным органом, обеспечивающим поддержание энергетического, температурного и метаболического гомеостаза животных. Предполагают, что эволюционные преобразования именно жировой ткани предопределили появление гомойотермии. В онтогенезе процессы пролиферации, дифференцировки, созревания жировых тканей предшествуют половому созреванию, предопределяют его сроки и темпы. В последние годы накопились многочисленные эпидемиологические наблюдения, экспериментальные доказательства определяющей роли жировых тканей в механизмах старения человеческого организма [Gasparetal., 2021].

1.2. Анатомо-морфологические, биохимические и функциональные особенности жировых клеток

1.2.1. Белый адипоцит

Часто описываемые в литературе морфологические черты белого адипоцита относятся к зрелой клетке, закончившей дифференцировку и вступившей в фазу липидной прогрессии. Зрелые адипоциты составляют 55-80% клеточного состава белой жировой ткани (в зависимости от специфики депонирования), также жировая ткань включает клетки стромально-сосудистого комплекса: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, преадипоциты, фибробласты, клетки эндотелия и гладкомышечной ткани, а также клетки иммунной системы. Белый цвет адипоцитов при

микроскопии вызван единственной имеющейся центральной вакуолью в виде жировой капли, которая содержит триглицериды и, в некотором количестве, эфиры холестерина и занимает до 90% объема клетки. Оставшийся объем приходится на ядро, деформируемое липидной каплей до серповидной формы, и тонкий слой цитоплазмы, содержащей небольшое количество митохондрий, гранулярный и агранулярный эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы и пиноцитозные везикулы. Базальная мембрана, окаймляющая каждый белый адипоцит, состоит в основном из коллагена IV типа. Диаметр зрелого адипоцита варьирует от 60 до 200 мкм, клетки округлой или полигональной формы [Cinti, 2012].

Основные метаболические пути белого адипоцита включают синтез жирных кислот из углеводов, синтез триглицеридов – липогенез, липолиз [Chouchani, Kajimura, 2019]. Необходимый для восстановительных биосинтезов НАДФН генерируется в пентозо-фосфатном пути. Основным поставщиком энергии для синтеза АТФ является бета-окисление жирных кислот. Глюкоза поступает в адипоцит с помощью инсулин-зависимого переносчика Глут 4, в пентозо-фосфатный путь ответвляется не более 10% глюкозо-6-фосфата, значительная часть проходит через гликолиз и окислительное декарбоксилирование пирувата. Образующийся в первой реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) цитрат далее распределяется на 2 пула. Один пул продолжает путь по ЦТК, другой пул цитрата с помощью трикарбоксилатного переносчика экспортируется в цитоплазму. Фермент АТФ-цитрат-лиаза (ACLY) катализирует расщепление цитрата до ацетил-коэнзима А и оксалоацетата. Оксалоацетат с помощью цитоплазматической малатдегидрогеназы и малик-фермента превращается в пируват и возвращается в митохондрию. При этом малик-ферментом генерируется дополнительное количество НАДФН. Ацетил-коэнзим А уходит в путь синтеза жирных кислот. В зрелом адипоците синтаза жирных кислот (FAS) и ацетилКоА-карбоксилаза (ACC) имеют очень высокое представительство, их экспрессия регулируется факторами транскрипции: стерол-реагирующий

белком С (SREBP 1c) и белком, связывающим углевод-реагирующий элемент (ChERBP). Таким образом, наряду с генерацией АТФ в окислительном фосфорилировании митохондрии адипоциты играют ключевую роль в синтезе жирных кислот *denovo* из глюкозы. Важными аллостерическими эффекторами являются цитоплазматические малонил-КоА и цитрат. Малонил-КоА, накапливаясь, ингибирует карнитин-пальмитоил-трансферазу (CPT1), требующуюся для транспорта жирных кислот в митохондрию; цитрат ингибирует фермент АСС, т.е. образование малонил-КоА. Снижение потребности в синтезе *denovo* жирных кислот и временное накопление этих интермедиатов происходит, например, при поступлении в адипоцит жирных кислот извне. В синтезе триглицеридов кроме активированных жирных кислот необходим глицерофосфат. Глицерофосфат синтезируется из образующегося в гликолизе диоксиацетонфосфата ферментом глицерофосфатдегидрогеназой (GPDA). Гликолитический НАДН может также передаваться митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназой (GPDM) в ЭТЦ, поэтому скорость GPDA реакции зависит от интенсивности митохондриального окисления через аллостерический контроль отношением НАДН/НАД.

Липолиз представляет последовательное гидролитическое отщепление жирных кислот ферментами триглицеридлипазой (ATGL), гормон-чувствительной липазой (HSL), моноглицеридлипазой (MGL). Скорость липолиза зависит от доступности для этих ферментов участков связывания с липидными каплями, которая регулируется поверхностным белком мембраны липидной капли – перилипином (PLIN1). Протеинкиназа А (PKA) фосфорилирует PLIN1 и HSL, облегчая взаимодействие ATGL с триглицеридом, а HSL с диглицеридом. PKA активируется через бета3-адренергический путь, сопряженный с аденилатциклазой и цАМФ сигналингом. При голодании или холодовых воздействиях с бета3-адренорецептором взаимодействует норадреналин из симпатических

нервных окончаний. Освобождаемые при липолизе жирные кислоты либо транспортируются из адипоцита и используются в других тканях и органах организма, либо могут использоваться в самом адипоците для митохондриального окисления, для синтеза фосфолипидов и стероидов.

Белая жировая ткань (БелЖТ) локализуется подкожно (более 80%) и висцерально. Подкожную БелЖТ можно подразделяют на верхнюю и нижнюю – абдоминальную и глутеофemorальную области соответственно. Жир висцерального отдела классифицируют как брыжеечный, сальниковый и ретроперитонеальный [Romantsova, 2021]. БелЖТ служит основным резервуаром для хранения липидов, а также является активным эндокринным органом [Rogersetal., 2012] Значительно отличаются от белых адипоцитов по морфофункциональным характеристикам бурые адипоциты.

1.2.2. Бурый адипоцит

Бурые адипоциты внешне отличаются от белых адипоцитов многочисленностью липидных капель – мультилокулярностью и высоким содержанием митохондрий. Содержание клеток с малым количеством или с одной липидной каплей не превышает 20% [Romantsova, 2021]

При световой микроскопии у бурого адипоцита также округлое ядро в центре или неподалеку от центра клетки, в цитоплазме заметен мелкий комплекс Гольджи, слабо развит ЭПР, в свободном доступе размещаются рибосомы и включения гликогена. Мощный энергетический потенциал бурых адипоцитов обусловлен наличием большого количества крупных митохондрий с высоким содержанием и активностью цитохромоксидазы, что в свою очередь обуславливает их бурую окраску [Ogurietal., 2020]. Бурые адипоциты вдвое меньше по размерам относительно белых адипоцитов (не более 60 мкм), имеют преимущественно полигональную форму [Romantsova, 2021].

В буром адипоците, как и в белом, важными метаболическими путями являются синтез жирных кислот из углеводов, окисление жирных кислот,

синтез триглицеридов и липолиз [Chouchani, Kajimura, 2019]. Поскольку первостепенной функцией буржт является производство тепла, доля окислительного катаболизма липидов существенно выше, чем в белом адипоците. Интенсивность процессов окисления определяется функционированием термогенного пути, ключевым элементом которого является разобщающий белок (uncoupling protein 1 UCP1) внутренней мембраны митохондрий. UCP1 формирует канал утечки H^+ через внутреннюю мембрану митохондрий в обход АТФ-синтазы, тем самым рассеивая энергию окисления и электрохимического потенциала H^+ в тепло. Разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания существенно увеличивает скорость потребления O_2 и интенсивность энергообмена буржт адипоцитов. Название белка UCP1 отражает его прямое участие в механизме разобщения окислительного фосфорилирования и дыхания.

UCP1 принадлежит к семейству SLC25, большому семейству митохондриальных переносчиков, ответственных за транспорт различных ионов и метаболитов через IMM [Kunjietal., 2020]. UCP1 активируется длинноцепочечными жирными кислотами и ингибируется свободными от Mg^{2+} пуриновыми нуклеотидами. Однако точный механизм разобщающего действия UCP1 окончательно не установлен, предложено несколько моделей его функционирования. Результаты использования метода patch-clamp свидетельствуют в пользу моделей, где анионы ЖК и H^+ являются транспортными субстратами UCP1, возможно, UCP1 действует как неканонический ЖК/ H^+ симпортер [Fedorenkoetal, 2012, Jezeketal., 2019].

Активация протонного транспорта через UCP1 и экспрессия гена UCP1 усиливается норадреналином, действующим через бета3-адренорецептор, цАМФ и цАМФ-зависимый фактор транскрипции CREB, взаимодействующий с промотором UCP1 [Li, Fromme, 2022]. Кроме того, в промоторе есть участки связывания для рецепторов трийодтиронина, рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR) и их агонистами (желчные кислоты, полиненасыщенные жирные кислоты,

простагландины) и др [Cecchinietal., 2018; Changetal., 2019; François, 2020]. Через эти и другие регуляторные элементы экспрессия UCP1 может изменяться также при разных пищевых режимах, кроме того, чувствительна к фотопериоду, двигательному режиму.

Бурые адипоциты образуют скопления бурой жировой ткани, локализованные в основном в верхней части туловища и шеи. Выделяют у мелких млекопитающих межлопаточное, заднее и переднешейное, подмышечное скопления. Черты бурого жира присущи жировой ткани, окружающей грудную аорту и ворота почек. Наиболее крупным и хорошо изученным является парное межлопаточное скопление, прикрывающее значительную часть спины животных и сосуды, собирающие кровь с кожи и поверхностных мышц спина и направляющие их в нижнюю полую вену; у взрослого человека наиболее развитыми являются надключичные скопления бурого жира (рис. 1)[Canon, Nedergaard, 2004; Gasparetal, 2021].

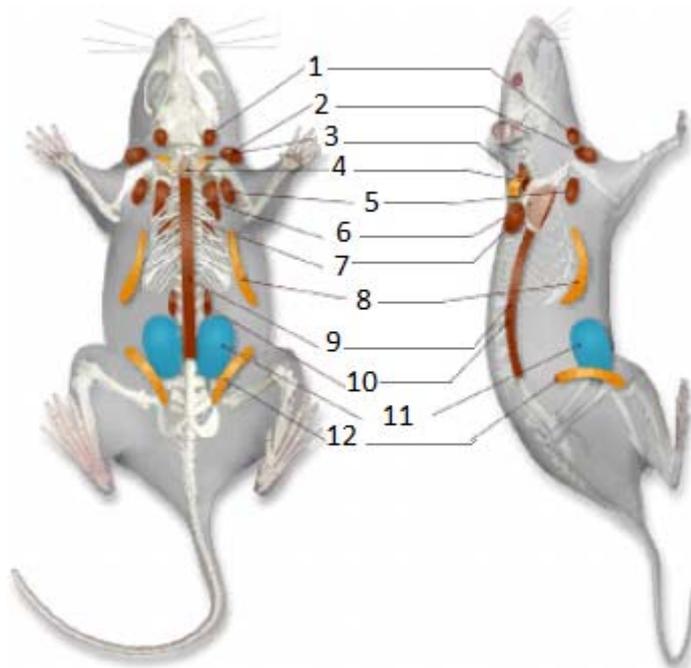


Рис. 1. Локализация жировых депо мыши: 1 – переднее шейное; 2 – надключичное; 3 – надлопаточное; 4 – надспинальное; 5 – подмышечное; 6 – подлопаточное; 7 – классическая бурая жировая ткань; 8 – передняя подкожная ЖТ; 9 – вентральный спинной

жир; 10 – околопочечный; 11 – окологонадная БелЖТ; 12 – паховая БелЖТ. Адаптировано Zang et al, 2018

В анатомических участках, соответствующих БелЖТ, после стимуляции могут образовываться бежевые/брайт адипоциты. Этот процесс носит название «browning» или потемнение, а образующиеся адипоциты называют «briteadipocytes» (brown-in-white) или бежевыми [Herz, Kiefer, 2019]. Бежевые адипоциты объединяют черты как белых, так и бурых жировых клеток, в зависимости от функционального состояния [Elsukovaetal., 2020].

1.2.3. Бежевый адипоцит

В состоянии покоя бежевый адипоцит морфологически сходен с белым (унилокулярные бледные клетки), но при стимуляции холодом происходит его активация, вследствие чего он приобретает схожесть с бурыми адипоцитами, выражающуюся в обилии митохондрий и мультилокулярности хранения липидов (с той лишь разницей что они более мелкие у бежевых адипоцитов) [Cinti, 2019]. Выделение их в отдельный клеточный тип произошло примерно на рубеже первого десятилетия XXIв., когда, благодаря прогрессу транскриптомного анализа, в них были выявлены специфические маркеры, отличные как от адипоцитов бурого жира, так и от доминирующих в жировых депо белых адипоцитов [Wueal., 2012]. Поскольку сведения о составе специфических маркеров и происхождении бежевых адипоцитов все еще неоднозначны и дискуссионны, об их присутствии в ткани обычно судят по экспрессии гена или белка UCP1. У лабораторных животных чаще эти клетки локализуются в подкожном паховом депо. В абдоминальном депо эти клетки практически не выявляются даже при холодовой адаптации у взрослых самцов. У самок экспрессия UCP1 определяется в окологонадном скоплении. Отличить бурый адипоцит от бежевого можно по экспрессии гена Zic [Jespersen, etal., 2013]. Присутствие бежевых адипоцитов сочетается с более оптимальным функционированием жировых тканей, с оптимальными

для здоровья индивида показателями углеводного и липидного обмена, резистентностью к ожирению [Bartelt, Heeren, 2014]. В отсутствии этих клеток у мышей с нокаутом гена дифференцировочного фактора PRDM16 нарушаются процессы клеточного обновления, развивается выраженная гипертрофия белых адипоцитов, увеличивается доля макрофагов, снижается чувствительность к инсулину [Cohenetal., 2014]. В лабораторной популяции аутбредных мышей ICR у особей с экспрессией белка UCP1 в абдоминальном жире уменьшен средний размер клеток, увеличено их количество [Elsukovaetal., 2016]. Трансплантация клеточных суспензий, обогащенных бежевыми адипоцитами, приводит к заметному улучшению метаболизма жировой ткани и улучшению обменных показателей всего организма в экспериментальных моделях висцерального ожирения, сахарного диабета 2 типа [Bartelt, Heeren, 2014].

1.3. Онтогенетическая динамика метаболических и функциональных свойств жировых тканей

В большей степени онтогенез жировых тканей изучен у лабораторных мышей. Крупные скопления БЖТ и БелЖТ начинают закладываться между 14-17 сут. пренатального развития [Елсукова, Медведев, 2016]. Дифференцировочный процесс в БЖТ завершается к моменту рождения, а первые содержащие липиды клетки БелЖТ формируются на 4-7 сут после рождения, из этого следует, что в процессе онтогенеза депо БЖТ появляются раньше, чем депо БелЖТ [Chabowska-Kitaetal., 2015]. К моменту завершения грудного вскармливания и выходу молодняка из гнезда в подкожной паховой и в абдоминальной ретроперитонеальной БелЖТ появляются бежевые адипоциты, что сопровождается потемнением этих жировых депо, усилением энергообмена в них. У лабораторных мышей к концу 2-3 месяца численность бежевых адипоцитов, экспрессия UCP1 в жировых депо быстро снижается.

По мере роста и взросления организма увеличивается масса жировых тканей. Относительная масса депо белой жировой ткани увеличивается, в

тоже время относительная масса скоплений бурого жира уменьшается. Сниженные темпы роста скоплений бурого жира отражают уменьшение потребности растущего организма в теплопродукции в связи с уменьшением теплопотерь. Не использованная на производство тепла энергия пищевых веществ в большей степени используется на рост тела, созревание функциональных систем, энергодепонирование в жировых депо.

Рост жировых тканей связан как с усиленной клеточной пролиферацией (гиперплазией), так и с гипертрофией самих адипоцитов. Увеличение адипоцитов путем гиперплазии коррелирует с повышенной чувствительностью к инсулину и метаболическим контролем и в большей степени проявляется у подкожных адипоцитов. [Mancuso, Bouchard, 2019]. В целом размеры и бурых и белых адипоцитов крупнее у взрослых по сравнению с молодыми животными. Увеличение размеров адипоцитов сочетается со снижением в них интенсивности окислительных путей, снижением интенсивности потребления O_2 . Возможно, уменьшение потребности в энергии обусловлено уменьшением синтеза липидов из углеводов *de novo*, так как усиливается приток жирных кислот извне в составе хиломикрон и ЛПОНП. Механизмы гипертрофического роста адипоцитов детальнее изучены в подкожном жировом депо, предназначенном для долгосрочного хранения липидов.

Росту клетки предшествует усиленный липогенез из экзогенных жирных кислот и слияние вновь образуемых липидных капель в одну с помощью усиленно экспрессируемых белков SNARE комплекса. Такая организация липидного депо в виде одной гигантской капли предотвращает легкую мобилизацию липолиза. В условиях избытка экзогенных жирных кислот стимулируется экспрессия белка альфа-Фетуина, который угнетает инсулин-зависимый транспорт глюкозы в адипоцит, секрецию адипонектина и синтез жирных кислот из глюкозы, уменьшая потребность в митохондриях [Trepanowsky et al., 2015]. Угнетение митохондриогенеза увеличивает пространство для растущей липидной капли. В дальнейшем

механическое растяжение мембраны адипоцита растущей липидной каплей приводит к активации инсулинового антилиполитического и ростового сигналинга [LiandSpalding, 2022], активации белковых синтезов. Однако относительная недостаточность шаперонов ЭПР и митохондриальных электрон-транспортных цепей приводит к окислительному стрессу и накоплению нефункциональных белков с нарушенной структурой (стресс ЭПР) [Masschelinetal., 2020]. Транскрипционный ответ на клеточный стресс заключается в синтезе и секреции специальных сигнальных danger-белков: HMGB, циклофилина А, РР1А, привлекающих в ткань провоспалительные макрофаги. Накоплению макрофагов и лимфоцитов способствует и изменение белкового состава коллагенового геля межклеточном матриксе, увеличение в нем белков люмикана, FХIII, повышающих резистентность матрикса к давлению со стороны гипертрофированных адипоцитов. С другой стороны, такое микроокружение неблагоприятно влияет на пролиферацию и дифференцировку преадипоцитов. Развитие хронического воспалительного процесса усиливает апоптоз адипоцитов. Таким образом, липидная экспансия и гипертрофический рост жировых клеток запускают их ускоренное старение и гибель и нарушают регенеративные процессы. Известно, что при старении масса подкожного депо снижается.

В отличие от подкожного депо масса абдоминальной жировой ткани не только не уменьшается при старении, а может увеличиваться. Объем депонирования экзогенных жирных кислот в висцеральном адипоците после редукции подкожной жировой ткани должен увеличиваться. Однако механизмы старения висцерального адипоцита изучены значительно слабее. В литературе имеются сведения о гипертрофии адипоцитов абдоминального депо, сопровождающейся нарушением чувствительности к инсулину, о синтезе в гипертрофированных адипоцитах провоспалительных адипокинов интерлейкина 6, фактора некроза опухолей, о накоплении макрофагов, окислительном стрессе. Наряду с процессами клеточной гибели в висцеральной жировой ткани увеличивается доля мелких адипоцитов с

нарушениями инсулинового сигналинга, повышенной интенсивностью липолиза [Francois, 2020] Активная секреция жирных кислот приводит к эктопическому отложению липидов в нежировых тканях – печени, миокарде, скелетной мускулатуре с нарушением их метаболизма и функциональности, развитием саркопении, неалкогольного жирового гепатоза, жировой дистрофии миокарда. Стимуляция стероидогенеза приводит к атеросклеротическим повреждениям сосудистой стенки. Этот комплекс изменений, инициируемый возрастной дисфункцией жировой ткани, получил название метаболический синдром [Kahn et al., 2019].

Таким образом, патогенез метаболического старения может быть представлен в следующей последовательности. Чрезмерная гипертрофия и связанные с ней нарушения клеточного метаболизма и апоптоз адипоцитов запускают 1) усиленную пролиферацию неполноценных новых адипоцитов; 2) хронический воспалительный процесс в жировых тканях, перерастающий в системный метаболический синдром.

Изучение базовых механизмов старения жировой ткани важно для определения профилактических мероприятий и терапевтических мишеней возрастных заболеваний [François, 2020]. Особый интерес представляет возрастная динамика экспрессии белка UCP1, так как присутствие и активность этого белка определяют интенсивность окислительных процессов и энергообмена, риск развития окислительного стресса и накопления нефункциональных белков. В настоящее время имеется одна работа, где у мышцей предрасположенной к ожирению и метаболическому синдрому линии мышцей C57Bl6 изучена экспрессия гена UCP1 в подкожной паховой жировой ткани в широком возрастном диапазоне. Значительное снижение мРНК UCP1 в паховом депо регистрировалось после полового созревания и затем в пожилом возрасте одновременно с появлением симптомов гипергликемии [Rogers et al., 2012; Kodde et al., 2019]. Однако изменения мРНК и самого белка UCP1 не всегда однонаправлены [Nedergaard, Cannon, 2013]. Сведения о динамике белка UCP1 в широком возрастном диапазоне отсутствуют. Еще

менее однозначны сведения для БЖТ и ГБелЖТ [Berryetal. 2017]. Почти нет работ, где бы одновременно фиксировалась возрастная динамика UCP1 в типичной бурой, типично белой и бежевой жировых тканях. Такие сведения могут представлять интерес, учитывая сообщения о компенсаторной активации бежевого адипогенеза у мышей с генетическим нарушением термогенеза в буром жире [Schulzetal. 2013].

Таким образом, имеющиеся сведения о влиянии возраста на экспрессию разобщающего белка UCP1 в жировых тканях даже у мышей одной линии разрозненны и не сопоставимы. Поэтому в лаборатории биохимии и физиологии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева возрастная динамика белка UCP1 в бурой жировой ткани, в подкожном и абдоминальном жировых депо аутбредных мышей ICR от окончания грудного вскармливания до старости.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ В ЛАБОРАТОРИИ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ ЭНЕРГООБМЕНА

2.1. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами физиологических экспериментов чаще всего становятся лабораторные животные, отвечающие требованиям высокой плодовитости, имеющие относительно короткие сроки развития и отличающиеся дешевизной содержания. Мыши и крысы, в связи с этим, приобрели особую популярность в качестве модельных организмов. Аутбредные мыши (полученные в результате скрещивания неродственных организмов, относящихся к разным линиям, породам) широко используются в исследованиях, посвященных вопросам онкологии, токсикологии, тератологии и старению. Особенности этих животных являются скрытые рецессивные признаки, которые могут проявляться у гибридов второго поколения. По этой причине, для воспроизводимости результатов, пригодны только гибриды первого поколения. [Елсукова Е.И., Якуненко А.В., 2021].

Анализ общего белка в организме помогает оценивать работу печени, поджелудочной железы, почек и др., рекомендуется с целью поиска нарушений в углеводном, липидном, белковом обмене. Одним из самых известных методов количественного определения белков в растворе является предложенный Оливером Лоури биохимический анализ, сочетающий реакции ионов меди с пептидными связями в щелочных условиях с окислением остатков ароматических белков [Lowry OH, 1951]. Особую значимость информация о содержании белковой фракции имеет и для проведения дальнейших исследований (определение нагрузки на гель для электрофореза).

Среди методов исследования белков электрофорез занимает центральное место. Метод позволяет разделять макромолекулы,

отличающиеся друг от друга размерами (молекулярными массами), пространственной конфигурацией, вторичной структурой и электрическим зарядом. Физический принцип метода основан на мигрировании макромолекул, изначально обладающих суммарным электрическим зарядом, под действием электрического тока и их разделении на зоны одинаковых молекул, перемещающихся с одинаковой скоростью [Остерман, 1981].

Наиболее чувствительными методами оценки количества специфического белка, такого как UCP1, остаются иммунохимические методы. В настоящее время самым популярным, широко используемым в исследованиях динамики белков в разных типах клеток и тканей является вестерн-блоттинг. Высокая разрешающая способность метода достигается благодаря: разделению смеси белков по молекулярной массе с помощью полиакриламидного геля электрофореза с додецилсульфатом натрия; использованию высокоспецифичных первичных и вторичных антител.

2.1.1. Экспериментальные животные

Исследования проведены на самцах мышей ICR, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» (Новосибирск) в возрасте 1,5 мес (пубертатный период). Животные содержались при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$, имели свободный доступ к корму (БиоПро, Новосибирск). Все манипуляции с животными проводились в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте или иных научных целях (Страсбург, 1986).

Вывод животных из эксперимента окончательно осуществляли в возрасте 20 сут (окончание грудного вскармливания), 1,5 мес (пубертатный период), 6 мес (репродуктивный возраст), 18 мес (завершение климактерического периода, старость). 20-сут мыши получены в лаборатории скрещиванием 2,5-мес мышей ICR. К 20 сут все молодые мыши перешли к питанию стандартным кормом и были отсажены от самок.

2.1.2. Экстирпация жировых тканей

Ткани выделяли сразу же после декапитации животных. Бурую жировую ткань выделяли из межлопаточной области. Источником типичной белой жировой ткани было окологонадное скопление; в качестве бежевой жировой ткани использовали подкожное паховое депо. В ходе морфометрического анализа регистрировались показатели абсолютной и относительной массы жировых тканей. Относительную массу рассчитывали в процентах от массы тела. Кусочки ткани массой около 30 мг для бурого жира и около 100 мг для окологонадной и паховой жировых тканей гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 0,5 мл 0,01 М трис-HCl буфера с 1 mM ЭДТА, pH 7,2 и до использования хранили в жидком азоте.

2.1.3. Определение общего белка в тканях по методу Лоури

Для определения тканевого белка гомогенаты подвергали солюбилизации с использованием сильного ионного детергента – додецилсульфата натрия (ДСН). Смешивали 0,024 мл гомогената и 1,6 мл раствора 1,5% ДСН и 0,66 NaOH. Смесь центрифугировали в течение 15 мин при 150 g. 21 Несолубилизованные кусочки ткани в ходе центрифугирования осаждались на дно пробирки. Отбирали 0,338 мл надосадочной жидкости, добавляли к ней 0,162 мл H₂O. При этом достигалось разбавление гомогената в 100 раз.

В основе метода Лоури проведение цветных реакций на пептидные связи и на ароматические аминокислоты, спектрофотометрия окрашенных белковых растворов при 750 нм и определение концентрации белка с помощью предварительно полученной калибровочной прямой. Общий белок рассчитывали в мкг/мг ткани.

2.1.3. Определение относительной экспрессии белка UCP1 в жировых тканях с помощью вестерн-блоттинга

Электрофорез по Лэммли [Laemmli, 1970] проводили по следующим этапам:

1) Приготовление электродного буфера

Для заполнения резервуара с гелями и электродами готовили электродный 25 мМТрис-глициновый буфер pH 8,3 с 0,1% ДСН. В качестве буфера нанесения использовали 62,5 мМТрисНСl с 2% ДСН, 10% глицерина, 5% меркаптоэтанола.

2) Пробоподготовка:

К 0,2 мл гомогената добавляется 0,043 мл 10% ДСН для того, чтобы освободить пробы от липидов, инкубировать 15 минут, после чего центрифугировать при 9000g 15 минут. После центрифугирования к супернатанту добавляют другие необходимые для приготовления пробы компоненты; их соотношения представлены ниже для бурой и белой жировых тканей. Готовые пробы инкубируют в кипящей воде в течение 4 мин.

Для бурой жировой ткани: 0,150 мл супернатант + 0,0045 мл трис (**1М, pH 6.8**) + 0,033 мл глицерина + 0,007 мл меркаптоэтанола + 0,004 бромфенолового синего

Для белой жировой ткани: 0,100 мл супернатант + 0,003 мл трис (**1М, pH 6.8**) + 0,0223 мл глицерина + 0,0045 мл меркаптоэтанола + 0,0025 бромфенолового синего

3) Приготовление гелей

Для приготовления гелей использовали раствор 30% акриламида и 1% бисакриламида, растворы 1 М ТрисНСl, pH 8,8 и 1 М ТрисНСl, pH 6,8, 10% раствор ДСН, 10% раствор персульфата аммония (ПСА) и тетраметилэтилендиамин - ТЕМЕД. Необходимые соотношения приведены в

таблице 1. Растворы ПСА и особенно ТЕМЕД, являющиеся катализаторами реакции полимеризации, добавляются перед заливкой геля

Таблица 1.

Приготовление гелей (на 2 пластины)

<i>Рабочий гель: 12,5%</i>	<i>Концентрирующий гель: 5%</i>
акриламид – 4,16 мл 1М трисрН 8.85 – 3.75 мл H ₂ O – 1.9 мл 10% ДСН – 0,1 мл 10% ПСА – 0,1 мл ТЕМЕД– 0.008 мл	акриламид – 1,67 мл 1М трисрН 6.8 – 1,26 мл H ₂ O – 6.95 мл 10% ДСН – 0,1 мл 10% ПСА – 0,1 мл ТЕМЕД– 0,01 мл

Собирали заливочный столик, собирали, устанавливали и закрепляли в нем пластины для заливки гелей между специальными стеклами. Сначала заливали между стеклами для электрофореза рабочий гель. После его полимеризации наносили слой концентрирующего геля и, не дожидаясь полимеризации последнего, вставляли «гребень» для формирования кармашков, предназначенных для размещения проб. В камере “Mini-Protean” (“Bio-Rad”, США) закрепляли стекла с гелем, вливали в камеру электродный буфер, затем микропипеткой аккуратно вносили пробы в кармашки геля. Первым заполняли кармашек для маркеров (в качестве стандартов молекулярной массы белка использовались окрашенные маркеры “Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder” (“ThermoFisher Scientific”, США)). Затем вносили пробы, содержащие по 20-25 мкг белка в приготовленные кармашки, не допуская их попадания в соседние лунки. Подключали камеру к устройству электропитания с напряжением 10 В для двух гелей, затем, по мере продвижения полосы, увеличивали до 20 В. Процесс электрофореза продолжался около 60 минут, об окончании процесса свидетельствовала

дошедшая до конца пластины полоса красителя бромфеноловым синим с молекулярной массой 10кДа.

Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 μ M, “Bio-Rad”, США) проводился методом мокрого переноса в буфере, содержащем 25 мМТрис-НСl, 192 мМ глицин, 10% этанол (v/v), при постоянном напряжении 30 в течение часа. Эффективность переноса контролировалась окраской мембраны Понсо С (Ponceau S). После обесцвечивания мембрана блокировалась в буфере TBST, содержащем 150 мМ NaCl, 50 мМТрис-НСl, 0.05% Твин-20 и 5% БСА, pH = 7.5. Первичные антитела к UCP1 (ab10983) и β -тубулину (ab6046), а также вторичные анти-кроличьи IgG (ab6722), конъюгированные с щелочной фосфатазой, приобретены в компании “Abcam” (США). β -тубулин использовался в качестве контроля при оценке относительной экспрессии. Разведение препаратов антител производили в соответствии с протоколами от производителя в буфере TBST с 5% БСА. Инкубацию мембран с первичными антителами производили в течение часа при комнатной температуре, затем отмывали TBST 3 \times 5 мин. Инкубацию со вторичными антителами делали по той же схеме. После инкубации проявление белковых полос на мембране осуществляли с помощью раствора BCIP/NBT (“SERVA Electrophoresis GmbH”, Германия). Анализ мембраны проводили в программе ImageJ 1.8.0.

2.1.4. Статистический анализ

Анализ и визуализация данных проведены с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 8.2.1. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (*sd*). Сравнение двух средних проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Для сравнения трех и более групп использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, при наличии значимых различий проводился post-hoc тест Данна. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

2.2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Использованные в работе группы мышей соответствовали периодам окончания вскармливания и выходу из гнезда (20 сут), половому созреванию (1,5 мес), половозрелому возрасту (6 мес), старости (18 мес). У 20-сут мышей межлопаточный бурый жир (МБЖТ) и паховый белый жир (ПБелЖТ) имели характерную для этих тканей локализацию и морфологию; абдоминальное депо жировой ткани практически отсутствовало. Все три изучаемых ЖТ были хорошо выражены у 1,5-мес мышей. На протяжении не менее 6 мес рост жировых депо опережал темпы роста тела, так как и абсолютная и относительная масса жировых депо непрерывно увеличивалась и достигала

Таблица2

Возрастная динамика массы тела, массы бурой и белой жировых тканей, содержания в них общего белка

Показатель	Возраст			
	20 сут (n = 18)	1,5 мес (n = 10)	6мес (n = 7)	18 мес (n = 3)
Масса тела, г	8,25±1,5	20,9±3,7	46,9 ±5,3	48,6 ±6,8
МБЖТ				
Масса, мг	51,4±12,7	71,2 ±18,6	185,9± 57,4	179,5± 19,8
Относительная масса, %	0,62±0,1	0,33± 0,06#	0,4± 0,1#	0,37± 0,04
Общий белок, мкг/мг	133,8±13,2	172,3± 78,3	86± 27*#	101,1± 9,7
ПБелЖТ				
Масса, мг	37,85±15,8	125,6± 75,7	480,7± 274,4	390,6± 421,6
Относительная масса, %	0,45±0,13	0,6± 0,4	1 ±0,5	0,73 ±0,7
Общий белок, мкг/мг	47±17,7	32,7± 6,1	18,5± 8,3#	30,9± 16,5
ГБелЖТ				
Масса, мг	-	166,8± 70,1	1052± 687	921,9± 982,3
Относительная масса, %	-	0,77 ±0,27	2,16 ±1,2*	1,75± 1,6
Общий белок, мкг/мг	-	27,7 ±9,5	12,6± 7,2*	12,2± 3,6*

Статистическая значимость различий: * - $p \leq 0.05$ в сравнении с 1,5 мес; # - $p \leq 0.05$ в сравнении с 20-сут.

максимальных значений у 6-мес мышей. Особенно значительные темпы роста регистрировались в ГБелЖТ, вес которой от 1,5 до 6 мес возрастал более чем в 6 раз, а относительная масса в 2,8 раза. В этот же период абсолютная и относительная масса ПБелЖТ увеличивалась только в 3,8 и в

1,66 раз соответственно. Двукратное снижение показателя содержания тканевого белка (мкг/мг) в обеих жировых депо, очевидно, свидетельствует об активном липогенезе. Как и ожидалось, рост МБЖТ, наоборот, отставал от роста тела, по крайней мере, в первые месяцы жизни. Относительная масса МБЖТ в период от 20 сут до 1,5 мес снижалась в 2 раза и в дальнейшем не изменялась. Как и в депо белой жировой ткани, в МБЖТ содержание тканевого белка у 6-мес мышей было в 2 раза ниже по сравнению с 1,5-мес животными. У 18-мес старых мышей масса тела и ЖТ не отличались от 6-мес животных. В паховом депо старых мышей среднее значение тканевого белка увеличивалось на 67% по сравнению с 6-мес мышами, но это увеличение не было статистически значимым. Таким образом, динамика показателей массы тела и ЖТ в постнатальном онтогенезе близка к описанной для инбредных линий мышей.

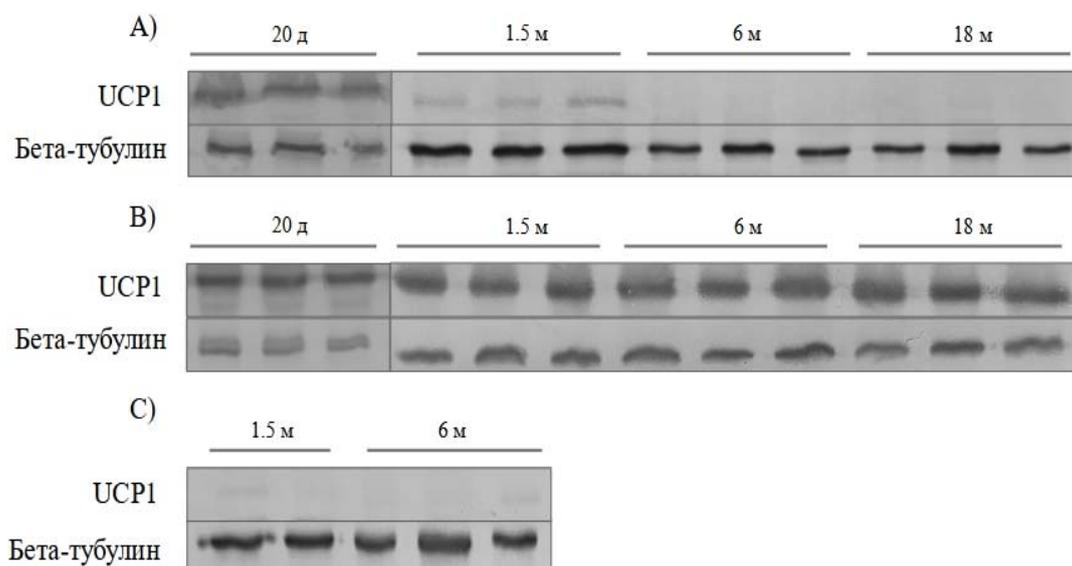


Рис. 2. Репрезентативные иммуноблотты проб жировых тканей мышей разного возраста. (А) – паховая белая жировая ткань, (В) – бурая жировая ткань, (С) – гонадная белая жировая ткань,

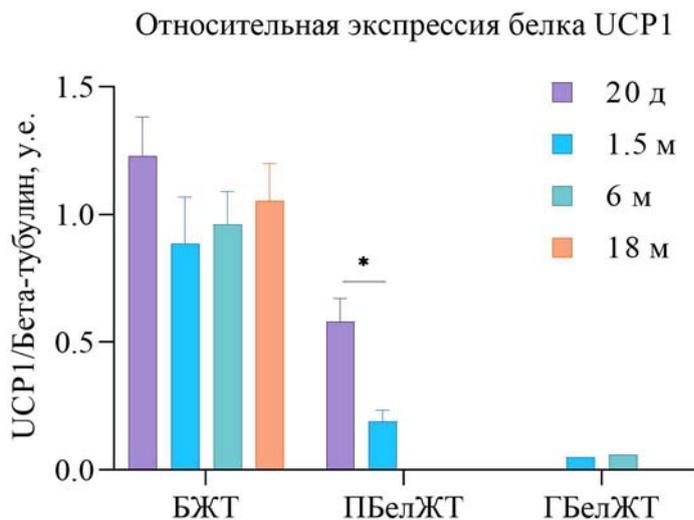


Рис. 3. Возрастная динамика показателей относительной экспрессии белка UCP1 (возрастные точки: 20 д, 1.5 м, 6 м, 18 м – 20 сут, 1.5 мес, 6 мес, 18 мес; * - $p < 0.05$ статистическая значимость различий по критерию Манна-Уитни)

Относительная экспрессия белка UCP1 в МБЖТ существенно не изменялась на протяжении всего онтогенеза. Наблюдалась тенденция к небольшому снижению этого показателя от выхода из гнезда до 1,5-мес возраста, затем он медленно увеличивался, однако эти изменения не были статистически значимы. В ПБелЖТ белок UCP1 присутствовал на всех блоках 20-сут и 1,5-мес мышей и не был идентифицирован ни в одной из проб 6-мес и 18-мес животных. Показатель относительной экспрессии UCP1 в ПБелЖТ 20-сут животных составлял примерно 50% от значения в МБЖТ. У 1,5-мес мышей относительная экспрессия UCP1 снижалась примерно в 3 раза по сравнению с 20-сут мышами. В ГБелЖТ полоса UCP1 выявлена в одной из трех проб у 1,5-мес мышей и в одной из 4 проб 6-мес мышей. Рассчитанные для этих полос значения относительной экспрессии UCP1 были на порядок ниже значений в ПБелЖТ 1,5-мес мышей.

Таким образом, для мышей ICR характерно раннее снижение экспрессии белка UCP1 в паховом депо, при этом в БЖТ уровень экспрессии UCP1 не только не снижался, а даже наблюдалась тенденция к ее увеличению. В работах с линией C57Bl/6J изменения в БЖТ и паховом депо

при старении хотя и в разной степени выражены, но обычно однонаправленны [Panetal., 2021; Shengetal., 2021]. В ГБелЖТ мышей ICR белок UCP1 определялся даже у половозрелых мышей, но не во всех, а только в 25-30% проб и не детектировался у старых мышей. Разница в величине относительной экспрессии UCP1 между ПБелЖТ и пробами ГбелЖТ с UCP1 была близка к различию уровней UCP1 между этими жировыми депо у мышей линии C57Bl/6J [Kodde, 2019]; сроки прекращения экспрессии белка UCP1 близки к данным в работе [Shengetal., 2021].

Полученным экспериментальным данным можно дать следующую интерпретацию. Максимальная экспрессия UCP1 и в буром, и в паховом жире мышей в ранние сроки после выхода из гнезда обеспечивает требуемый для температурного гомеостаза термогенез. Потребность в нем снижается по мере роста тела, развития шерстного покрова, развития скелетной мускулатуры, роста подвижности, соответственно снижаются темпы роста бурого жира, экспрессия в нем и в ПБелЖТ UCP1, расширяются возможности больше распределить энергосубстратов на рост основных жировых депо и липогенез в них и в БЖТ. В подкожном депо прекращение экспрессии UCP1 способствует его функции долгосрочного депонирования триглицеридов. Поддерживаемая у некоторых мышей в окологонадной жировой ткани малочисленная популяция клеток с UCP1, возможно, представляет эволюционно закрепленный резерв для быстрого включения в них термогенеза, предотвращения необратимых повреждений репродуктивной функции при угрозе гипотермии и сохранении популяции животных. Это тем более важно, что в подкожном депо процессы трансдифференцировки белых в бежевые адипоциты, экспрессии в них гена UCP1 разворачиваются в течение нескольких суток [Cinti, 2012]. Соответственно с угасанием репродуктивной функции исчезает необходимость поддерживать клетки с UCP1. Присутствие белка UCP1 в ГБелЖТ не у всех животных дает возможность сопоставить в дальнейшем

экспрессию UCP1 в этом депо с обменными, поведенческими и другими показателями.

ГЛАВА 3 ПРОЕКТИРОВАНИЕ И ОРГАНИЗАЦИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ 10-11 КЛАССОВ

Лаборатория биохимии и физиологии энергообмена сотрудничает с образовательными учреждениями г. Красноярска в организации научно-исследовательской работы школьников по современным направлениям биологии. Ежегодно в составе научного физиологического общества студентов и старшеклассников школьниками специализированных естественнонаучных классов выполняется несколько экспериментальных работ. В ходе работы над исследовательскими проектами по физиологии и биохимии жировых тканей обучающиеся глубже знакомятся с фундаментальными принципами строения и функционирования живого организма, физико-химическими механизмами клеточного метаболизма, современными научными проблемами организменной биологии, значением фундаментальных научных исследований для развития медицины. Интерес школьников стимулируется знакомством и работой с современным научным оборудованием. В ходе такой работы актуализируются и приводятся в общую систему не только биологические и химические знания, происходит также интеграция технических и физических знаний, формируются метапредметные связи внутри комплекса естественных наук.

3.1. Общие принципы организации НИР школьников в лаборатории биохимии и физиологии

Работа школьников в научной лаборатории, безусловно, требует постоянного внимания и контроля сотрудников как с точки зрения охраны здоровья самого ребенка, так и для сохранения целостности лабораторного оборудования, экспериментальных животных и пр. Важно, чтобы обучающиеся в лаборатории не чувствовали себя обузой, а принимали посильное полезное участие в общем эксперименте. Участие в

экспериментальной работе лаборатории развивает понимание коллективного характера современной науки, воспитывает аккуратность и ответственность за свой вклад в коллективный научный труд. Ответственность за деятельность обучающихся в лаборатории берет на себя наставник, который обеспечивает связь школьников с сотрудниками и друг с другом. Особой задачей куратора НИР становится заблаговременная подготовка плана работы, дидактических материалов с учетом их интересов, мотиваций, их здоровья, наличия свободного времени и др. В ходе накопленного опыта по общению со школьниками в лаборатории сформировалась определенная последовательность их привлечения к работе.

Первый этап включает знакомство с обучающимся, в ходе которого выясняются интересы, мотивации школьников. После определения с темой целесообразно порекомендовать литературу для чтения и погружения в тему исследования. Этот этап должен обязательно завершаться обсуждением прочитанного, выделением ключевых вопросов, гипотез и др. В том случае, если формируется коллектив школьников, работающих по близким темам, обсуждение может проводиться в форме научно-методологического семинара. Цель такого семинара – обсуждение проблемы старения участниками, занимающимися ее частными вопросами, попытка обсудить разные стороны проблемы. Это не просто расширяет знания о проблеме, но и помогает лучше увидеть свою роль в ее решении, углубляя интерес и мотивацию к научно-исследовательской деятельности. В более частном случае школьники могут восполнить упущенный при самостоятельном чтении материал и получить ответы на возникающие вопросы.

Следующим этапом работы является планирование - составление индивидуального плана НИР, в котором должны быть отражены этапы работы юного исследователя, примерные сроки их выполнения и примерные результаты на каждом из этапов. Далее важно объяснить обучающимся важность протоколирования эксперимента, какую информацию должен содержать протокол. Экспериментальный протокол – самый главный

документ биолога. Иногда рекомендуют школьникам по ходу выполнения исследовательской работы оформлять паспорт НИР, который кроме описания полученных на каждом этапе результатов фиксирует тему исследовательской работы, ее актуальность, объект, цель и задачи, гипотезу и методы исследования, список используемых источников. Паспорт НИР облегчит подготовку отчета, итогового доклада. В тоже время важно не перегрузить начинающего исследователя документацией; избыток заполняемых бумаг отвлекает от работы и может привести к потере интереса к ней.

Эксперименту предшествует знакомство с оборудованием лаборатории и техникой безопасной работы в ней. Научная лаборатория – зона повышенной опасности для школьников. Источниками опасности являются лабораторные животные, химические реагенты, электроприборы. В связи с чем для обучающихся в обязательном порядке требуется провести инструктаж по технике безопасности. Основу правил работы в лаборатории составляет состояние здоровья и самочувствие обучающихся. Еще на первом этапе при планировании НИР куратор должен убедиться о наличии/отсутствии аллергии на животных и химические реактивы, о неврологических расстройствах. Следует обратить внимание обучающихся на то, что все манипуляции следует проводить исключительно с чисто вымытыми руками, обязательно в чистых перчатках, и в белом халате, во избежание попадания опасных веществ на кожу рук и одежду. Отдельный вид работы с обучающимися, предваряющий выполнение НИР, должен быть посвящен безопасному обращению с лабораторным оборудованием и посудой.

Запланированные опыты школьник проводит под контролем наставника. Перед опытом проверяется необходимый комплект оборудования, растворов на рабочем месте, их безопасная эргономичная расстановка, знание обучающимся всех необходимых манипуляций. Как правило, в ходе опыта обучающемуся требуются консультации, поэтому наставник должен постоянно присутствовать в лаборатории. В ходе работы и

сразу после нее важно проконтролировать, чтобы школьник не забывал делать необходимые записи. После завершения экспериментальной части требуется обсуждение – все ли удалось выполнить согласно намеченному плану, какие манипуляции вызвали наибольшие трудности, если были допущены какие-либо экспериментальные просчеты – как они отразятся на результатах работы, требуется ли повторение эксперимента.

3.2.Этапы работы с обучающимися

В 2022/23 г в качестве основного направления НИР старшекласников была запланирована тема «Биохимические механизмы старения жировых тканей лабораторных мышей». По окончании первой серии экспериментов по возрастной динамике белка UCP1, в рамках этого общего направления определились две конкретные темы научно-исследовательских работ школьников: 1) «Содержание общего белка в бурой и белой жировых тканях молодых и старых мышей»; 2) «Разобщающий белок в межлопаточной бурой и подкожном депо белой жировой ткани молодых и старых мышей».

Обучающиеся 10 класса МБОУ СОШ №62 с углубленным изучением биологии и химии с октября 2022 года посещали занятия преподавателей КГПУ им. В.П. Астафьева на факультете биологии, географии и химии. В рамках занятий была проведена экскурсия в лабораторию биохимии и физиологии энергообмена, после которой три десятиклассницы приняли приглашение принять участие в выполнении научно-исследовательского проекта.

В ходе знакомства, обсуждения примерных тем выявились слабые представления школьниц о биохимических основах энергетического обмена клетки. Их знания ограничивались представлением о роли процессов окислительного катаболизма в высвобождении энергии питательных веществ, об ее использовании для синтеза АТФ. Представления об этапах и механизмах биологического окисления, электрон-транспортной цепи (ЭТЦ),

хемиосмотическом сопряжении процессов окисления и синтеза АТФ были не сформированы из-за крайне поверхностного изучения этого материала в объеме существенно меньше, чем в школьных учебниках для углубленного изучения биологии. Трудно было опереться и на физические представления об энергии, ее превращениях в клетке из-за слабых знаний девочками основ молекулярной физики и термодинамики и негативного отношения к предмету Физика. Несколько примеров серьезных заболеваний, связанных с нарушением митохондриальной энергетики, короткий рассказ о многообразии жировых клеток, о «полезных и вредных» адипоцитах потребовались, чтобы преодолеть сомнения школьниц и увлечь их предложенными темами. Поскольку в школьной программе темы, посвященные белкам и липидам, носят общий ознакомительный характер, первым этапом работы со школьниками стало восполнение и углубление знаний школьниц о молекулярной и клеточной биологии, а также знакомство с основами биохимии. С этими целями для обучающихся было рекомендовано изучение научно-популярной литературы:

- 1) Ноу Ли. Эгоистичная митохондрия. Как сохранить здоровье и отодвинуть старость. СПб: Питер, 2020. 304 с
- 2) Джейсон Фанг. Дикий гормон. М: Бомбора 2019, 336 с
- 3) Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. 7-е изд. М.: Лаборатория знаний, 2021. 509 с.

В этих изданиях доступно с качественными иллюстрациями изложены основы митохондриальной энергетики, значение этих знаний для медицины; гормональная регуляция процессов депонирования энергии в жировой ткани, термогенеза в бурой жировой ткани. Учебник Кольмана, Рема и др по сути представляет яркий атлас биохимических процессов, причем для каждого рассматриваемого процесса имеется набор иллюстраций разной степени сложности. Кроме того, были найдены доступные для понимания видеоматериалы, которые наглядно объясняют процесс липидного транспорта, принцип работы ЭТЦ, дают представление о синтезе жирных

кислот. Современные школьники глубоко погружены в зарубежную культуру, это обстоятельство позволяет предоставлять им информационные источники в том числе на иностранном языке.



Рис. 1. Транспорт липидов ч.1 Рис. 2. Транспорт липидов ч.2. Рис. 3. Транспорт липидов ч.3



Рис. 4. Синтез жирных кислот Рис. 5. Дыхательная цепь переноса электронов Рис. 6. Разобщающие белки (термогенин)

После знакомства школьниц с литературными и видеоисточниками, состоялось несколько встреч с наставником. В ходе первой из них обсуждали изученный материал. Обучающиеся имели возможность задавать вопросы для более полного понимания. Например, их интересовал вопрос «Применим ли изученный механизм разобщения дыхания и фосфорилирования к организму человека?».

Следующие две встречи имели целью подготовку к экспериментальной части работы. На одной из них обучающиеся получили навыки работы с аналитическими весами, автоматическими микропипетками, научились пользоваться спектрофотометром, узнали устройство и принцип работы электрофоретической камеры. На второй – подготовили оборудование,

посуду и реактивы, ознакомились с правилами протоколирования эксперимента.

По просьбе школьниц предварительно сформулированные две темы НИР были объединены в один научно-исследовательский проект.

Экспериментальная часть состояла из двух частей работы, первая началась с определения содержания общей фракции белка в заранее заготовленных для этого гомогенатах бурой и окологонадной белой жировых тканей. Определению белка предшествовало объяснение химических основ метода Лоури. Каждый этап работы требовал указаний и четкого контроля наставника. Действуя сообща и соблюдая все рекомендации руководителя проекта, обучающиеся успешно воспроизвели сопоставимые результаты, которые были получены в лаборатории ранее.

Вторая часть работы была проведена спустя несколько дней, так как требовала дополнительной теоретической подготовки. Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блот проводили с большой осторожностью и аккуратностью, все манипуляции – исключительно под наблюдением наставника.

После завершения каждой части работы следовала обязательная рефлексия, имеющая целью выяснить: «Что лучше всего получилось сделать в ходе работы?», «Чему следует еще поучиться, чтобы в следующий раз чувствовать себя более уверенно?», «Какие манипуляции показались наиболее трудными?».

При выполнении НИР обучающиеся проявили себя по высшей мере ответственно, несмотря на некоторые сложности, которые были связаны с 1) недостатком времени для присутствия на всех этапах эксперимента; 2) трудностями концентрации внимания и памяти при выполнении многоступенчатой работы. В целом, все школьницы справились со своими задачами, поставленными перед началом исследований, старались предельно аккуратно работать с растворами, лабораторной посудой и оборудованием.

Завершением успешного опыта работы в лаборатории биохимии и физиологии стала подготовка доклада и публикации обучающихся в материалах научно-практической конференции «БиоЭко» 2023, проводимой в рамках XXIII Международного научно-практического форума студентов, аспирантов и молодых ученых.

3.3. Организационно-методические документы к научно-исследовательскому проекту обучающихся

Организационно-методические документы включали пояснительную записку к проекту, примерный план НИР. В пояснительной записке доступно с учетом возраста и знаний школьника излагается научная проблема, актуальность ее изучения для фундаментальной науки, для практики медицины, ветеринарии и др, формулируется гипотеза, ставится цель и задачи исследования. Составление плана НИР вызывает наибольшие сложности из-за занятости как наставника, так и школьников. Соответственно, сложности усугубляются при подготовке плана совместной НИР нескольких школьников, поэтому в ходе работы план может корректироваться. Ниже представлены тексты пояснительной записки и откорректированного плана совместной НИР школьниц.

Пояснительная записка к выполнению научно-исследовательского проекта учениц 10 класса МБОУ СОШ №62 Огрызковой Дарье, Теряевой Софии, Климовой Ксении

Тема проекта: «Содержание общего белка и разобщающего белка UCP1 в пробах термогенных жировых тканей при старении лабораторных мышей».

Актуальность темы и теоретическое обоснование:

Любая живая клетка нуждается в энергии для роста, регенерации клеточных структур, выполнения своей функции. Источником энергии является окисление питательных веществ. В клетке энергия окисления трансформируется в энергию макроэргической связи АТФ. АТФ – переносчик энергии к рабочим процессам клетки, АТФ синтезируется

ферментом АТФ синтетазой во внутренней мембране митохондрии. Перенос энергии к АТФ синтетазе –многоступенчатый процесс. Сначала электроны от окисляемых субстратов через цепь специальных переносчиков (электрон-транспортную цепь) во внутренней мембране митохондрий на кислород. Освобождаемая энергия используется протонными насосами для выкачивания из матрикса митохондрии наружу протонов H^+ . Движение H^+ обратно по градиенту концентрации через специальный канал запускает в АТФ-синтетазе синтез АТФ. Млекопитающие способны поддерживать высокие скорости обменных процессов перенаправляя часть энергии в обход АТФ-синтетазы на производство тепла. В специальных бурой и бежевой жировых тканях во внутренней мембране митохондрий есть разобщающий белок. Разобщающий белок открывает канал для протонов H^+ и рассеивает энергию протонного градиента в тепло, т.е. разобщает процесс окисления от синтеза АТФ. Работа разобщающего белка в клетках бурого жира регулируется - при понижении температуры окружающей среды, когда возникает угроза гипотермии и нарушения работы внутренних органов – разобщающий белок усиленно продуцирует тепло. Этот процесс называется *факультативным* (т.е. происходящим только при определенных условиях) *термогенезом*. Бурый жир генерирует с высокой мощностью тепло. При небольших колебаниях температуры ($<1\text{ }^{\circ}\text{C}$) в тонкой настройке температурного гомеостаза близлежащих органов участвуют бежевые адипоциты с меньшим содержанием разобщающего белка и более слабой генерацией тепла.

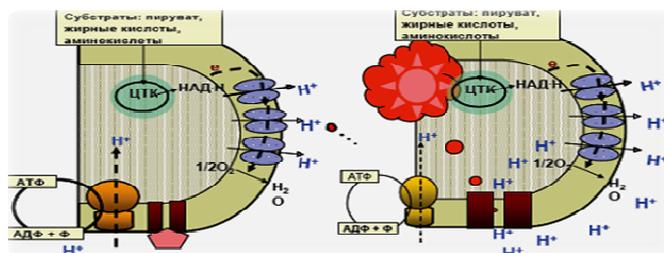


Рис. 7. Общая схема термогенеза разобщающего белка 1

Гипотеза: синтез разобщающего белка после взросления постепенно снижается, что может приводить к замедлению процессов окисления. Уменьшение расхода энергии на термогенез приводит к ее перераспределению на запасание липидов в жировых депо. Чрезмерный рост липидного депо нарушает процессы метаболизма в организме, приводит к развитию сахарного диабета, жировой дистрофии органов, атеросклерозу и преждевременному старению.

Цель работы: сравнение содержания разобщающего белка в жировых тканях молодых и старых лабораторных мышей.

Планируемый продукт проекта: Доклад и тезисы для публикации в материалах научно-практической конференции «БиоЭко»

План работы:

План объединенного научно-исследовательского проекта Климовой Ксении, Огрызковой Дарьи, Теряевой Софии обучающихся 10 «А» класса МБОУ СШ

№62

Этапы работы	Сроки	Содержание работы
1) Изучение литературных и других информационных источников, помогающих понять специфику работы лаборатории биохимии и физиологии энергообмена, инструктаж по ТБ	18.10.2022-02.11.2022	Четко сложившиеся представления о работе лаборатории биохимии и физиологии энерго обмена; изучена необходимая литература и др. информационные источники выслушан инструктаж
2) Встреча с наставником для обсуждения изученных источников и формулирования темы, цели и задач исследования	02.11.2022-16.11.2022	Обсуждены возникшие в ходе ознакомления с работой лаборатории и источников информации; Определена тема научно-исследовательского

		проекта, поставлена цель, определены задачи исследования
3) Встречи с наставником для подготовки к экспериментальной части работы над проектом	17.11.2022-25.11.2022	Выполнена подготовка к экспериментальной части работы: познакомились с принципом работы аналитических весов, спектрофотометра, устройством и функционированием электрофоретической камерой; Получены навыки работы с автоматическими пипетками, лабораторным оборудованием
4) Проведение первой части экспериментальной работы	28.11.2022	Оформлен протокол экспериментальной части, выполнена первая часть опыта; Обсуждение, расчеты результатов
5) Проведение второй части экспериментальной работы	30.11.2022	Выполнен и запротоколирована вторая часть эксперимента;
6) Обсуждение результатов первой и второй части эксперимента; начало работы над подготовкой доклада и оформлением тезисов для публикации;	07.12.2022	Обсуждение результатов всего исследования; намечено направление на написание тезисов
7) Дополнительный поиск и изучение литературы по теме исследования	08.12.2022-16.01.2023	Оформление списка литературы
8) Написание доклада, подготовка презентации и материалов к публикации	18.01.2023-07.02.2022	Сформулированы основные тезисы
9) Редакция работы наставником	07.02.2023-14.02.2023	-
10) Заключительная часть	16.02.2023-21.02.2023	Полностью готовые тезисы

подготовки работы к публикации*		для публикации
---------------------------------	--	----------------

* окончательный вариант тезисов отправлен вместе с заявкой на участие в научно-практической конференции «БИОЭКО»

Последняя часть работы предполагала выступление со стендовым докладом на школьной секции или устный доклад на студенческой секции по экспериментальной биологии научно-практической конференции «БиоЭко» и публикацию тезисов. Школьницами был выбран стендовый доклад. Текст доклада и тезисов готовился одновременно. В качестве дополнительной информации школьники использовали текст уже принятой к печати научной статьи сотрудников лаборатории по этой тематике, сами проводили поиск на научно-популярном сайте elementy.ru. Трудности, испытываемые школьницами, включали преобразование устной речи в научный формат, недостаточный опыт работы с диаграммами в программе Microsoft.Excel. Тезисы были своевременно подготовлены и приняты к публикации.

Обучающиеся успешно выступили со стендовым докладом поочередно, лаконично дополняя друг друга. С поставленными задачами поильно справились. Школьницы получили удовольствие над проделанной работой, что следовало из заключительной беседы с ними.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В постнатальном онтогенезе в белой жировой ткани накапливаются адипоциты со сниженными инсулин-зависимым транспортом глюкозы, синтезом *denovo* и бета-окислением жирных кислот, низкой интенсивностью липолиза, усиленным липогенезом на основе экзогенных жирных кислот. Рост липидной капли сопровождается недостаточностью фолдинга белков в ЭПР, окислительным стрессом, секрецией воспалительных цитокинов. Предполагается, что этим изменениям предшествует уменьшение экспрессии белка UCP1 в бурых и бежевых адипоцитах.

2. Для интегральной оценки метаболической активности жировой ткани может использоваться показатель содержания общего белка в мг ткани. Метод вестерн-блоттинга позволяет не только идентифицировать присутствие белка UCP1 в пробах жировых тканей, но и выявить различия его экспрессии относительно референсного белка бета-тубулина у животных разного возраста.

3. У мышей ICR в репродуктивно-активном возрасте снижается содержание общего белка во всех трех типах жировых тканей. В течение всего изученного онтогенеза экспрессия белка UCP1 в бурой жировой ткани поддерживается на высоком уровне. В подкожном депо белок UCP1 не определяется уже после полового созревания. В окологонадном депо низкие уровни UCP1 присутствуют у 30% молодых и взрослых животных и не определяются у старых мышей.

4. На основе полученных экспериментальных результатов разработаны две индивидуальные темы НИР для обучающихся 10-11 классов и организационно-методические документы к ним. Апробация обеих НИР реализована обучающимися 10 А класса МБОУ СШ №62. Подготовлен

стендовый доклад. Тезисы доклада школьников приняты к печати в сборнике материалов научно-практической конференции студентов и аспирантов «БиоЭко» (КГПУ им. В.П. Астафьева, Красноярск).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Федеральный закон «Об образовании в Российской Федерации» от 29.12.2012 N 273-ФЗ (последняя редакция) [Электронный ресурс] URL: https://sh-kumakskaya--solileckij-r56.gosweb.gosuslugi.ru/netcat_files/userfiles/GIA_11/273-fz.pdf (дата обращения: 20.03.2023)
2. «Примерная основная образовательная программа начального общего образования» (одобрена решением Федерального учебно-методического объединения по общему образованию, протокол от 15.09.2022 N 6/22) [Электронный ресурс] URL: <https://fgosreestr.ru/uploads/files/48f0c657a155e6e9b9ce99ac9d5b2604.pdf> (дата обращения 20.03.2023)
3. Елсукова Е. И., Медведев Л. Н. Новый тип термогенных адипоцитов: происхождение, свойства, функции //SiberianJournalofLifeSciencesandAgriculture. – 2016. – №. 8 (80). – С. 97-127.
4. Замкин П.В. Исследовательская деятельность обучающихся: учебно-методическое пособие. Саранск: Мордовский государственный педагогический университет, РИЦ МГПУ, 2020. 132 с. [Электронный ресурс] URL: <https://reader.lanbook.com/book/176282#3> (дата обращения 21.03.2023)
5. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань: молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза - Красноярск: Изд-во Амальгама, 2002. - 528 с.
6. Елсукова Е.И., Якуненков А.В. Введение в физиологический эксперимент. Основы планирования эксперимента и статистического

- анализа данных в физиологии: учебное пособие. Красноярск: Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева, 2021. 112 с.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и центрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. 288 с.
 8. Berry DC, Jiang Y, Arpke RW, Close EL, Uchida A, Reading D, Berglund ED, Kyba M, Graff JM Cellular aging contributes to failure of cold-induced beige adipocyte formation in old mice and humans // *Cell Metabol.* 2017. V. 25. P.166–181.
 9. Gaspar RC, Pauli JR, Shulman GI, Muñoz VR (2021) An update on brown adipose tissue biology: a discussion of recent findings // *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism.* V.320. P. E488–E495. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00310.2020>
 10. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. // *Physiol. Rev.*, 2004, 84, pp. 277–359.
 11. Cinti S. The adipose organ at a glance. // *Disease Models Mechanisms.* 2012. V. 5, pp. 588–594.
 12. Cinti S. White, brown, beige and pink: A rainbow in the adipose organ // *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research.* 2019. V. 4. P. 29-36.
 13. Cohen P., Levy JD, Zhang Y, Frontini A., et al Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. // *Cell*, 2014, 156, pp. 304–316.
 14. Chabowska-Kita A, Trabczynska A, Korytko A, Kaczmarek MM, Kozak LP Low ambient temperature during early postnatal development fails to cause

- a permanent induction of brown adipocytes // The FASEB J. 2015. V. 29. P.3238–3252.
- 15.Chouchani E. T., Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue //Nature metabolism. 2019. V. 1. P. 189-200.
- 16.Elsukova E. I. Two-Level Organization of Thermogenesis in Adipose Tissue: aMorphofunctional Hypothesis //Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2019. T. 55. C. 388-397.
- 17.Fedorenko A., Lishko P.V., Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. // Cell, 2012, 151, pp. 400–413.
- 18.François Gagné. Regulation of thermogenesis in Brown and Beige Adipose Tissues. 2020 - 8(6).
AJBSR.MS.ID.001328.DOI:[10.34297/AJBSR.2020.08.001328](https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001328).
- 19.Friedman J. M. Leptin and the endocrine control of energy balance //Nature Metabolism. 2019. V. 1. P. 754-764.
- 20.Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Dugaard, S. et al A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans // Cell Metab. 2013. V.17. P. 798–805.
- 21.Ježek, P., Jabůrek, M., & Porter, R. K. Uncoupling mechanism and redox regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Bioenergetics.2019. V.1860.P. 259-269.
- 22.Kahn, C. R., Wang, G., & Lee, K. Y. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome //The Journal of clinical investigation.2019.V.129.P. 3990-4000.

23. Kodde A, Engels E, Oosting A, Van Limpt K, Van der Beek EM, Keijer J
Maturation of white adipose tissue function in C57bl/6j mice from weaning
to young adulthood // *Front Physiol.* 2019. V. 10. 836.
24. Herz C. T., Kiefer F. W. Adipose tissue browning in mice and humans
// *Journal of Endocrinology.* – 2019. – T. 241. – №. 3. – C. R97-R109.
25. Kodde A, Engels E, Oosting A, van Limpt K, van der Beek EM, Keijer J.
Maturation of White Adipose Tissue Function in C57BL/6j Mice From
Weaning to Young Adulthood. *Front Physiol.* 2019 Jul9;10:836. doi:
10.3389/fphys.2019.00836.
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the
head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi:
10.1038/227680a0. PMID: 5432063.
27. Li, Y.; Fromme, T. Uncoupling Protein 1 Does Not Produce Heat without
Activation // *Int. J. Mol. Sci.* 2022.V. 23, 2406. <https://doi.org/10.3390/ijms23052406>
28. Li Q., Spalding K. L. The regulation of adipocyte growth in white adipose
tissue // *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2022. V. 10.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1003219>
29. Masschelin, P. M., Cox, A. R., Chernis, N., & Hartig, S. M. (2020). The
impact of oxidative stress on adipose tissue energy balance. // *Frontiers in
physiology.* 2020. V10. doi: 10.3389/fphys.2019.01638
30. Medvedev, L. N., Elsukova E.I. Can thermogenic adipocytes protect from
obesity? // *Journal of Physiology and Biochemistry.* 2015. V. 71 (№ 4). P.
847-853

31. Mancuso P, Bouchard B. The Impact of Aging on Adipose Function and Adipokine Synthesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Mar 11;10:137. doi: 10.3389/fendo.2019.00137. PMID: 30915034; PMCID: PMC6421296.
32. Nedergaard J, Cannon B. UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2013. V. 1831. P. 943–949. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.01.009>
33. Oguri Y, Kajimura S. Cellular heterogeneity in brown adipose tissue. *J Clin Invest*. 2020; 130 (1): 65-67 <https://doi.org/10.1172/JCI133786>
34. Pan XX, Yao KL, Yang YF, Ge Q, Zhang R, Gao PJ, Ruan CC, Wu F. Senescent T Cell Induces Brown Adipose Tissue "Whitening" *Via* Secreting IFN- γ . *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 4;9:637424. doi: 10.3389/fcell.2021.637424. PMID: 33748126; PMCID: PMC7969812.
35. Parra-Peralbo E., Talamillo A., Barrio R. Origin and development of the adipose tissue, a key organ in physiology and disease // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. V. 9. P. 3636.
36. Rogers NH, Landa A, Park S, Smith RG. Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue // *Aging Cell*. 2012. V. 11. P. 1074–1083. <https://doi.org/10.1111/accel.12010>
37. Romantsova T.I. Adipose tissue: colors, depots and functions // *Obesity and metabolism*. 2021. V. 18(3). P. 282-301. (In Russ.) <https://doi.org/10.14341/omet12748>
38. Rosen E.D., Spiegelman B.M. What we talk about when we talk about fat? // *Cell*. 2014, vol. 156, pp. 20–44.
39. Sanchez-Gurmachez J., Guertin D. Adipocyte Lineages: Tracing Back the Origins of Fat. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, 1842, pp. 340–351.

40. Schulz TJ, Huang P, Huang TL, Xue R, McDougall LE, Townsend KL, Cypess AM, Mishina Y, Gussoni E, Tseng Y-H Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat // *Nature*. 2013. V.495 P.379–383. <https://doi.org/10.1038/nature11943>
41. Trepanowski J. F., Mey J., Varady K. A. Fetuin-A: a novel link between obesity and related complications // *International journal of obesity*. 2015. V. 39. P. 734-741.
42. Wu J., Boström P., Sparks L., Ye L., et al Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human // *Cell*. 2012. V.150. P. 366–376.
43. Qian S., Tang Y., Tang Q. Q. Adipose tissue plasticity and the pleiotropic roles of BMP signaling // *Journal of Biological Chemistry*. 2021. V. 296. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100678>
44. Sheng Y, Xia F, Chen L, Lv Y, Lv S, Yu J, Liu J, Ding G. Differential Responses of White Adipose Tissue and Brown Adipose Tissue to Calorie Restriction During Aging. *J GerontolA Biol Sci Med Sci*. 2021 Feb 25;76(3):393-399. doi: 10.1093/gerona/glaa070
45. Zhang F, Hao G, Shao M, Nham K, An Y, Wang Q, Zhu Y, Kusminski CM, Hassan G, Gupta RK, Zhai Q, Sun X, Scherer PE, Oz OK. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab*. 2018 Jan 9;27(1):252-262.e3. doi: 10.1016/j.cmet.2017.12.004. PMID: 29320705; PMCID: PMC5764189.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

Тезисы обучающихся, принятые к публикации в материалах конференции
«БиоЭко»

**СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА И РАЗОБЩАЮЩЕГО БЕЛКА UCP1 В
ПРОБАХ ТЕРМОГЕННЫХ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ ПРИ СТАРЕНИИ
ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ**

К.А. Климова, Д.Н. Огрызкова, С.А. Теряева

Klimova K.A., Ogryskova D.N., Terayeva S.A.

Научные руководители: Е.И. Елсукова, И.О. Наточий

Scientific advisers: E.I. Elsukova, I.O. Natchi

*Буряя и белая жировые ткани, общий белок, разобщающий белок
UCP1, старение*

Изучение молекулярных механизмов старения важно для коррекции возрастных нарушений здоровья и достижения активного долголетия. В жировых тканях (ЖТ) из-за чрезмерного накопления липидов нарушения метаболизма, митохондриальной энергетике развиваются раньше, чем в других структурах. В ЖТ кроме адипоцитов, запасующих липиды, имеются бурые и бежевые адипоциты, «сжигающие» избытки липидов с помощью митохондриального разобщающего белка UCP1. UCP1 стимулирует метаболизм ЖТ и организма в целом. Целью работы был сравнительный анализ содержания общего белка и белка UCP1 в бурой жировой ткани (БЖТ) и в подкожной белой жировой ткани (ПБелЖТ) 1,5 мес и 18 мес лабораторных мышей.

Общий белок в пробах тканей определяли методом Лоури [Lowry, 1952]. В его основе цветные реакции на белки и спектрофотометрическая оценка интенсивности окраски. Определение белка UCP1 – многоэтапный процесс. Белковую смесь обрабатывали ионным детергентом, придающим белкам отрицательный заряд, пропорциональный их массе. Пробы с одинаковым количеством белка разделяли ПААГ электрофорезом на белковые полосы определенной массы и осуществляли их электроперенос на нитроцеллюлозу. Белок UCP1 в полосе 32кДа идентифицировали специфическими антителами. Для прочного удержания на пленке и

проявления комплекс UCP1-антитело обрабатывали вторичным антителом к антителу UCP1, меченым щелочной фосфатазой. При проведении цветной реакции полоса UCP1 имела интенсивность, пропорциональную его количеству в ткани.

Установлено, что у старых мышей в пробах БЖТ содержание общего белка снижалось на 41%, интенсивность полосы UCP на блотах не отличалась от молодых мышей. Следовательно, при старении в БЖТ содержание UCP1 снижается пропорционально снижению общего белка. Содержание общего белка в ПБелЖТ у старых мышей не отличалось от молодых, но полоса UCP1 полностью отсутствовала, следовательно, эта ткань теряла способность к удалению избытка липидов с помощью теплопродукции.

- 1) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farrar AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J BiolChem. 1951 Nov;193(1):265-75.

Список публикаций автора ВКР по теме исследования

- 1) Лукьянцев В.И., Наточий И.О., Якуненков А.В. Возрастная динамика белка UCP1 в термогенных жировых тканях мышей при адаптации к разным температурным и пищевым режимам/Лукьянцев В.И., Наточий И.О., Якуненков А.В.//Биология. Медицина. Психология: Материалы 60-й Междунар. науч. студ. конф. 10-20 апреля 2022 г. Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2022. С134
- 2) Лукьянцев В.И., Наточий И.О. Влияние возраста, холодových экспозиций и пищевой рестрикции на содержание белка UCP1 в бурой и подкожной белой жировых тканях мышей ICR/Лукьянцев В.И., Наточий И.О.// Современные биоэкологические исследования Средней Сибири: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО». Красноярск: Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева, 2022. С 164-168
- 3) Наточий И.О. Проект научно-исследовательской работы коллектива старшеклассников «Биохимические механизмы старения жировой ткани»/Наточий И.О.// Современные биоэкологические исследования Средней Сибири: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО». – в печати
- 4) Якуненков А.В., Елсукова Е.И., Наточий И.О. Динамика разобщающего белка UCP1 в жировых тканях аутбредных мышах ICR в постнатальном онтогенезе/Якуненков А.В., Елсукова Е.И., Наточий И.О.// Журнал эволюционной биохимии и физиологии 2023. Т54 №4 – в печати

Приложение В

Сертификаты обучающихся об участии в научно-практической конференции
«БиоЭко»





Приложение Г

Индивидуальные достижения автора ВКР по теме исследования





