

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ им. В.П.АСТАФЬЕВА (КГПУ им. В.П. Астафьева)

Факультет биологии, географии и химии

Кафедра биологии и экологии

Гурков Никита Александрович

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Тема: Проектирование исследовательской работы школьников по теме
«Сравнительная физиология жировой ткани»

Направление подготовки 44.03.05 «Педагогическое образование»

Направленность (профиль) образовательной программы Биология и химия

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ

Зав. кафедрой биологии и экологии
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный
педагогический университет им. В.П. Астафьева»

Антипова Екатерина Михайловна
д-р биол. наук, проф., канд. биол. наук



(дата, подпись)

Руководитель Елсукова Елена Ивановна
канд. биол. наук, доцент



Дата защиты 24.06.2017

Обучающийся

Гурков Никита Александрович



(дата, подпись)

Оценка отлично

(прописью)

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Гетерогенность жировой ткани. Происхождение, особенности биохимии, клеточной биологии бурой белой и бежевой жировых тканей.....	5
1.2. Исследования жировых тканей у мелких млекопитающих из природных популяций.....	8
ГЛАВА 2. ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СВОБОДНООБИТАЮЩИХ ЖИВОТНЫХ. ПОДБОР АДЕКВАТНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ У ЖИВОТНЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ.....	12
2.1. Животные.....	13
2.2. Морфологическое исследование жировых тканей.....	13
2.3. Биохимические анализы жировых тканей.....	14
2.4. Статистический анализ.....	15
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	16
3.1. Анатомо-морфологические особенности жировых тканей мышевидных грызунов из природных популяций.....	16
3.2. Биохимические показатели жировых тканей свободнообитающих мышевидных грызунов и лабораторных мышей.....	17
ГЛАВА 4. УЧАСТИЕ СТРАШЕКЛАССНИКОВ В ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.....	23
4.1. Общие принципы организации исследовательской деятельности учащегося.....	23
4.2. Разработка материалов и основных этапов исследовательской работы учащегося.....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	34
ВЫВОДЫ.....	36
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	37

ВВЕДЕНИЕ

Поиск способных, увлеченных исследовательской деятельностью в определенной сфере науки школьников всегда был приоритетным направлением профориентационной работы вузов и академических институтов. Одной из форм такой работы является выполнение старшеклассником исследовательского проекта при вузовской или академической лаборатории [7]. Небольшой опыт такой работы со старшеклассниками имеется в лаборатории физиологии и биохимии энергообмена ФБГХ КГПУ.

Научное направление лаборатории связано с изучением комплексной реакции жировых тканей млекопитающих на пищевые и температурные факторы среды. Значительный интерес в последние годы биологов разных профилей к жировым тканям связан с их важной ролью в эволюции гомойотермии, их определяющим влиянием на темпы как раннего, так и позднего онтогенеза [31]. Жизнь современного человека в термонейтральной среде с неограниченным доступом к высокоусвояемым энергоемким пищевым продуктам неизбежно сопровождается, с одной стороны дистрофией термогенной бурой жировой ткани с другой стороны функциональной перегрузкой, компенсаторным ростом, а затем также дистрофическими изменениями основных депо белой жировой ткани [2, 14, 31]. Проявлением этих тенденций является абдоминальное ожирение и связанный с ним метаболический синдром, по сути, представляющий вариант ускоренного метаболического старения [4]. Одним из подходов к выяснению эволюционно закрепленной «физиологической нормы» функционирования жировых тканей являются сравнительные исследования на животных из природных популяций.

Целью квалификационной работы была разработка тематики исследовательских проектов старшеклассников по сравнительной физиологии жировых тканей

Основные задачи включали:

1. Анализ современного состояния исследований проблем сравнительной физиологии жировых тканей;
2. Подбор методов для оценки энергообмена, термогенного потенциала жировых тканей животных в природных популяциях;
3. Предварительные сравнительные исследования жировых тканей у полевок и мышей из природных популяций и у лабораторных мышей;
4. Разработка материалов к исследовательской работе учащейся и ее апробация

Работа состоит из 3-х глав. В первой главе представлен обзор литературы по теме исследования, во второй главе обосновываются подходы к изучению жировых тканей у животных из природных популяций, описаны использованные методы, в третьей главе представлены и обсуждаются предварительные результаты, обоснованы направления и перспективы дальнейших исследований, в четвертой главе обсуждаются результаты участия старшеклассников в проведенных исследованиях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гетерогенность жировой ткани. Происхождение, особенности биохимии, клеточной биологии бурой белой и бежевой жировых тканей

Стремительное распространение ожирения и тесно связанных с ним метаболических расстройств послужило толчком к интенсивным исследованиям физиологии и биохимии жировой ткани. За последние 20 лет количество статей по проблемам физиологии жировых тканей в международной базе данных Pubmed выросло более чем в 7 раз [23, 31]. Жировая ткань все чаще рассматривается как особый жировой орган, выполняющий функции центрального эффектора в системе энергообмена, нутриентного гомеостаза, терморегуляции [18, 35, 36].

Анатомически жировая ткань представлена хорошо оформленными скоплениями жировых клеток – адипоцитов. Традиционно жировую ткань делят на белую и бурую, соответственно выделяют белые и бурые адипоциты. Скопления белого жира преимущественно выполняют энергозапасующую функцию и поэтому часто называются депо. Основные депо белого жира – подкожное и абдоминальное [8, 18]. У лабораторных мышей и крыс в подкожном депо, как правило, доминирует по размерам паховое скопление, в абдоминальном депо – окологонадное, ретроперитонеальное, мезентериальное скопления. Самые крупные скопления бурого жира – межлопаточное, шейное, подмышечное, околопочечное [18, 19].

В адипоцитах высокоактивны пути синтеза жирных кислот, липогенеза и липолиза [18]. Синтезированные триглицериды хранятся в виде капель, окруженных монослойной фосфолипидной мембраной. Количество капель и их размер пропорциональны метаболической активности клетки [8, 17, 23]. Зрелый белый адипоцит часто содержит одну крупную каплю, занимающую центральное положение. При разных режимах ограничения питания доля адипоцитов с многими липидными каплями возрастает [18].

Белые адипоциты секретируют освобождающиеся при липолизе жирные кислоты, неостребованные в других тканях жирные кислоты в комплексе с альбумином, в составе триглицеридов липопротеинов особо низкой плотности и хиломикронов возвращаются обратно. Адипоциты содержат инсулин-зависимый переносчик глюкозы и активно синтезируют на основе глюкозы жирные кислоты и триглицериды [31].

Бурые адипоциты мельче белых, неправильной формы, с большим количеством мелких липидных капель и митохондрий [18]. Освобождающиеся при липолизе жирные кислоты используются в них для термогенеза. В основе термогенеза – транспорт протонов в матрикс митохондрий в виде протонированных жирных кислот с помощью специфического разобщающего белка 1 (uncoupling protein 1 – UCP1), составляющего в бурых адипоцитах 10-30% от всего митохондриального белка [23, 24]. Липолиз, термогенез, а также пролиферация и дифференцировка преадипоцитов запускается освобождаемым из симпатических окончаний норадреналином. Холод и угроза гипотермии – основной физиологический стимул для термогенеза и адаптивного роста скоплений бурого жира. Скопления бурого жира подогревают мышцы открытых участков спины, передних конечностей, собираемую от них и направляемую в сердце кровь, шейный бурый жир подогревает кровь в позвоночных артериях [23].

В 80-90 г. была описана конвертируемая жировая ткань, появляющаяся в депо белого жира при адаптации животных к низким температурам [34]. Она представлена небольшими скоплениями буроподобных клеток с белком UCP1, полностью идентичным этому белку в бурых адипоцитах [2]. По форме, размерам, содержанию UCP1-позитивных митохондрий, биохимическим и функциональным признакам эти клетки представляют как бы переходную форму между типичными белыми и типичными бурыми адипоцитами. Увеличение этих клеток сопровождается изменением цвета жировых депо, появлением буроватых оттенков, поэтому их часто называют бежевыми адипоцитами [28]. До сих пор не решен вопрос о путях их появления –

дифференцировка из клеток-предшественников или трансдифференцировка белых адипоцитов. По результатам транскриптомного и протеомного анализа, бежевые, как и белые адипоциты ведут свое происхождение от клеточной линии, отличной от бурых адипоцитов [34].

Вопрос о функциях этого нового типа термогенных жировых клеток на сегодняшний день самый дискутируемый в физиологии жировых тканей [21]. Само по себе наличие UCP1 предполагает потенциальное участие этих клеток в факультативном термогенезе. Многие факты подтверждают это предположение. Термогенез в типичном буром жире активируется в момент рождения, а немногочисленные у новорожденных бежевые адипоциты достигают максимального содержания в паховом и ретроперитонеальном депо мышей к 20 суткам [18]. Этот период окончательного выхода молодых животных из гнезда, по-видимому, предъявляет повышенные требования к факультативной теплопродукции. В отличие от типичного бурого жира, сохраняющегося в течение всей жизни животного, содержание бежевых адипоцитов снижается до следовых количеств в жировых депо мышей старше 3 мес. Но ежедневные холодовые экспозиции замедляют их исчезновение или реактивируют эту клеточную популяцию термогенных адипоцитов у взрослых животных [28, 34]. В последние годы идентифицирован еще ряд экспериментальных воздействий, активирующих эту клеточную популяцию [2, 9, 28]. Однако отношение этих воздействий к температурному фактору не всегда понятно. Сомнения относительно термогенной функции бежевых адипоцитов возникают и в связи с слабыми, недостаточно воспроизводимыми термогенными ответами депо белого жира на холод [18, 21, 34]. Поэтому эти клетки долгое время не привлекали внимание исследователей, пока не обнаружилось, что линии лабораторных мышей с повышенным содержанием бежевых адипоцитов в жировых депо устойчивы к диет-индуцированному ожирению, и трансплантация фрагментов пахового жира, обогащенного этими клетками, улучшает показатели углеводного и липидного обмена животных [2, 23, 28, 31].

Является ли термогенез единственным путем положительного влияния бежевых адипоцитов на энергообмен и метаболизм, или проводниками этого действия являются какие-то адипокины этих клеток – пока этот вопрос остается открытым [32, 37, 38, 40]. Значимость выяснения функций бежевых адипоцитов связана с тем, что термогенная жировая ткань человека представлена в основном этими клетками, а не бурыми адипоцитами [2, 23, 28].

Сведения о клеточном составе, о биохимических путях, основных функциях жировых тканей, секретируемых ими адипокинах, механизмах адаптивного роста получены в лабораторном эксперименте. Расширить эти представления могли бы исследования на свободнообитающих животных.

1.2. Исследования жировых тканей у мелких млекопитающих из природных популяций

Основная трудность проведения таких исследований – частое отсутствие возможности применения современных инструментальных, биохимических методов в полевых условиях, поэтому, как правило, ограничиваются регистрацией морфометрических показателей [1, 11]. В исследованиях подобного рода установлены возрастные, видовые особенности массы, цвета бурого жира, сезонная динамика его скоплений. В целом, анализируя видовые особенности скоплений бурого жира, можно отметить, что у животных, относящихся к одному семейству, например, наиболее изученному семейству *Rodentia*, их относительная масса тем выше, чем мельче размеры животных [8]. Другим фактором, оказывающим, по-видимому, влияние на массу скоплений бурого жира, является частота использования и глубина торпидных состояний. Наиболее значительно количество бурого жира у гибернантов, особенно перед зимней спячкой [6, 8, 29]. Наблюдения в природе и экспериментальные данные показывают, что масса бурого жира быстро снижается в течение нескольких часов, когда происходит пробуждение животного. Это, по-видимому, может свидетельствовать о значительной гипертрофии бурых адипоцитов перед пробуждением. Чрезвычайно высокая интенсивность термогенеза в

межлопаточном и шейном скоплениях, необходимая для быстрого разогрева мозга, крупных мышц приводит к истощению липидных капель в адипоцитах и уменьшению объема клетки. С учетом новых фактов о цитотоксическом эффекте термогенеза большой мощности [20, 23], представляет интерес вопрос - имеют ли место процессы апоптоза, какова их интенсивность в буром жире в ходе пробуждения.

У многих мелких негибернантов масса бурого жира испытывает выраженные сезонные колебания [17, 22, 32, 34]. При исследованиях сезонной динамики жировых тканей важно учитывать возрастную структуру популяции, наличие двух генераций грызунов с разным типом онтогенеза. Осенняя генерация – это неполовозрелые животные, рост которых тормозится до весны, тем не менее, в начале осени начинается адаптивное увеличение массы межлопаточного бурого жира. Весной абсолютная масса скоплений бурого жира практически не меняется, а относительная масса снижается в связи с весенним ростом животного. Летом возрастная структура популяции грызунов в природе очень сложна, включает кроме перезимовавших животных половозрелых животных, рожденных весной и неполовозрелый молодняк [11]. Поэтому в сравнительных исследованиях средние показатели массы бурого жира группы половозрелых животных могут быть завышены из-за присутствия животных осенней генерации.

Масса скоплений бурого жира не всегда отражает его термогенный потенциал, а в некоторых физиологических ситуациях даже обратно коррелирует с показателями термогенной активности, функционального термогенного резерва. Например, у самок узкочерепной полевки масса межлопаточного и околотитовидного бурого жира существенно увеличивалась в ходе беременности, однако, судя по цвету этих скоплений, их обводненности митохондриогенез и окислительная активность в них были угнетены [1]. Функциональный термогенный резерв ткани определяется количеством митохондрий, содержанием дыхательных комплексов, содержанием разобщающего белка [8]. Эти параметры определены в ряде работ, но

процедуре определения предшествовал отлов животных, и их содержание в условиях вивария или вольера, которые, как правило, не имитируют весь комплекс факторов естественной экологической ниши для данного вида. Процедура отлова, транспортировки и условия вивария являются сильными стрессорами, существенно влияющими на нейроэндокринный статус и симпатический тонус «диких» животных [20]. В лабораторных условиях сопоставлялись показатели массы МБЖТ, содержания в нем общего белка, разобщающего белка, активность цитохромоксидазы у разных видов грызунов, а также их реакция на холодовые стимулы. Было установлено, что виды с одинаковой массой тела, обитающие в южных регионах Китая с субтропическим и тропическим климатом при холодной адаптации значительно сильнее увеличивают обмен покоя по сравнению с отловленными в северных районах. Такой более значительный прирост потребления кислорода сочетается у них с слабовыраженными адаптивными изменениями или даже их отсутствием в буром жире [25]. Сделан вывод о разных стратегиях адаптации к холоду. Бурый жир, локально подогревая только жизненно важные органы, участки с особенно высокими теплопотерями, обеспечивает более экономный тип ответа на низкие температуры. Среди обитателей северных регионов Китая красно-серая полевка отличалась от полевой и восточноазиатской лесной мыши большим содержанием в буром жире разобщающего белка, повышенной активностью цитохромоксидазы [26]. Сезонные исследования с имитацией природных температурных условий в основном обнаруживают характерные для холодной адаптации изменения общего и митохондриального белка, содержания UCP1 в буром жире [27]. В отношении клеточности, размеров липидных капель в образцах бурого жира сведения менее однозначны, эти и некоторые другие параметры бурого жира могут меняться у разных видов неодинаково в течение сезона, кроме того реакция жировых тканей на холод и другие стимулы даже у животных одного вида может качественно различаться при обитании в условиях естественной среды и в лаборатории [17].

По сравнению с бурым жиром данные по белым жировым депо у природных грызунов особенно немногочисленны. В частности, до сих пор неизвестно – присутствует ли UCP1 в белом жире грызунов в природных популяциях. Ранее UCP1 был обнаружен в висцеральном белом жире пищухи (*Ochotona curzoniae*) [16] и гималайского листоноса (*Hipposideros armiger*) [33], но детекции этого маркера термогенных адипоцитов предшествовали отлов животных, их транспортировка и адаптация к низким температурам в условиях лабораторного вивария. Поэтому полученные результаты не сняли вопрос о том, является ли появление бежевых адипоцитов нормальным вариантом реакции на холодовые воздействия.

ГЛАВА 2. ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СВОБОДНООБИТАЮЩИХ ЖИВОТНЫХ. ПОДБОР АДЕКВАТНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ У ЖИВОТНЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Физиологическое исследование свободнообитающих животных сталкивается с целым рядом проблем. Первая группа проблем связана с возможностью осуществить поиск и отлов достаточного для статистического анализа количества особей одного вида, пола, относящихся к интересующей исследователя возрастной группе, имеющих сходный физиологический статус. Следующая группа проблем связана с влиянием процедуры отлова на функциональное состояние животного, включая опасность травмирования животного, последствия острого стресса при транспортировке отловленных животных в лабораторию, сложные нейроэндокринные перестройки в ходе адаптационного синдрома [20,30], если предполагается длительное наблюдение за животным в лабораторных условиях. Высокий уровень катехоламинов у стрессированных животных значительно снижает достоверность результатов исследований энергообмена как на уровне животного, так и на клеточно-тканевом уровне. Имеющие хорошо развитую симпатическую иннервацию жировые ткани особенно чувствительны к последствиям острого стресса. Поэтому при планировании исследований в рамках проектов было решено исключить работу с живыми объектами. Подбирались методы отлова, обеспечивающие мгновенную смерть животного. Для мелких грызунов это использование ловушек Геро. К тому же этот способ умерщвления природного животного согласуется с принципами Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986). Учитывая привлечение школьников к работе, такой способ получения биологического материала оказывает минимальное психотравмирующее воздействие на детей.

2.1. Животные

Как показали предварительные исследования, в окрестностях Красноярска среди отловленных животных наиболее часто встречаются темная полевка (*Microtus agrestis*), красная полевка (*Clethrionomys rutilus*), восточно-азиатская лесная мышь (*Apodemus peninsulae*). Отлов животных производился в июне – июле 2015-2016.г. С учетом суточной активности этих грызунов в летний период ловушки устанавливались в 23-24.00 и проверялись около 5-ти ч. утра; таким образом, время от момента смерти до выделения жировых тканей не превышало 5 ч. В этот сезон в отловах преобладали половозрелые самцы. Для биохимических анализов ткани транспортировали в лабораторию в жидком азоте.

Для сравнительных исследований удобным лабораторным контролем к свободнообитающим грызуном являются самцы аутбредных мышей. Наиболее распространена, доступна для приобретения линия *ICR*, поддерживаемая в питомниках ГНЦ ВБ «Вектор», «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск).

2.2. Морфологическое исследование жировых тканей

Для всех видов анализов удобно использовать наиболее крупные и компактные скопления межлопаточного бурого жира, паховой и окологонадной белой жировых тканей [1]. Морфология обоих типов жировых тканей значительно варьирует в зависимости от функционального состояния. Особую информативность имеет цвет жировых скоплений, зависящий от содержания митохондриальных цитохромов, т.е. потенциально отражающий интенсивность окислительных процессов. В ходе морфометрического анализа регистрировали показатели абсолютной и относительной массы межлопаточного бурого жира и пахового белого жира и визуально оценивали цвет этих скоплений.

2.3. Биохимические анализы жировых тканей

Биохимическое исследование включало определение в тканевых гомогенатах содержания ДНК в качестве косвенного показателя размеров адипоцитов, содержания общей фракции РНК, общего белка, воды, отражающих метаболическую и окислительную активность жировых тканей. Кроме того, для прямой оценки термогенного потенциала жировых тканей у темной полевки, восточноазиатской мыши и лабораторных мышей в них оценивали содержание разобшающего белка UCP1. В белом жире UCP1 маркирует популяцию термогенных бежевых адипоцитов [18].

Кусочки ткани массой около 30 мг гомогенизировали в 0,5 мл 0,01 М трис-НСl буфера с 1 мМ ЭДТА, рН 7,2 [9]. Содержание воды определяли, высушивая кусочки тканей до постоянного веса при 105 °С [1]. Содержание ДНК и РНК оценивали по результатам спектрофотометрии при 270 и 290 нм тканевых гидролизатов [15]. Общий белок определяли по методу Лоури. Белок UCP1 идентифицировали в гомогенатах жировых тканей с помощью иммуноблоттинга [19]. ДСН-ПААГ электрофорез проводили в буферной системе Laemmly с концентрацией рабочего геля 12,5%. Перед электрофорезом пробы разбавляли до равенства концентраций белка, на гель наносили по 40 мкг белка проб межлопаточного бурого жира и по 80 мкг белка пахового белого жира. Электроперенос белка с геля на нитроцеллюлозу (размер пор – 0,4 мкм) проводили полусухим способом на мощности 3 Вт в 25 мМ Трис-глициновом буфере рН 8,5. Для выявления полосы UCP1 использовали препараты антител компании Sigma Aldrich (USA): кроличьи антитела против синтетического N-концевого пептида UCP1 и козьи антитела против IgG кролика, меченные щелочной фосфатазой. Инкубации с антителами, проявление полосы UCP1 проводили в соответствии с рекомендациями производителя – компании Sigma Aldrich (USA). Титр первичных и вторичных антител составил 1:500. Интенсивность полосы UCP1 оценивали с помощью программы GelAnalyzer2010a и выражали в условных единицах на мкг белка.

2.4. Статистический анализ

Все показатели представлены в виде средних и их статистических ошибок. Различия между группами животных оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD) в программе "Statistica 6" StatSoft.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Анатомо-морфологические особенности жировых тканей мышевидных грызунов из природных популяций

У свободнообитающих грызунов жировая ткань была представлена скоплениями бурого и белого типов. Их анатомическая локализация не различалась у отловленных и лабораторных животных. Скопления бурого жира включали межлопаточное, шейное, подмышечные; околотитовидное (между долями щитовидной железы). Наиболее крупным, легко идентифицируемым было межлопаточное скопление. Относительная масса межлопаточного бурого жира статистически не различалась в изученных группах животных (табл. 1). Темные варианты окраски межлопаточного скопления чаще наблюдались у восточноазиатской мыши и красной полевки, наоборот, относительно бледнее выглядел бурый жир лабораторных мышей. Кроме того, у лабораторных мышей бурый жир сверху был прикрыт слоем белой жировой ткани.

У всех отловленных грызунов наблюдалась выраженная редукция основных подкожного и абдоминального депо белой жировой ткани (табл. 1). Относительная масса пахового жира составляла около 0,3%, что более чем в 4 раза меньше чем значения этого показателя в группе лабораторных мышей. Основные скопления абдоминальной жировой ткани – окологонадное и ретроперитонеальное у большинства животных присутствовали в следовых количествах (менее 15-20 мг), их количественное выделение было затруднено. Подкожный жир у отловленных животных отличался более темными оттенками цвета, часто имел темно-розовое и даже буроватое окрашивание. Таким образом, морфологические черты пахового жира указывают на повышенное содержание митохондриальных цитохромов, что характерно для UCP1 позитивных адипоцитов бежевого типа.

Таблица 1

Абсолютная и относительная масса основных скоплений бурой и белой жировых тканей свободнообитающих грызунов и лабораторных мышей

Животные	Масса тела	Межлопаточная бурая жировая ткань, мг / %	Паховая белая жировая ткань, мг / %
Лабораторные мыши <i>ICR</i> , n=10	35,33±3,12	141,33±11,80 0,41±0,06	490,10±16,18 1,41±0,14
Восточноазиатская мышь, n=10	25,70±3,21	98,12±11,10 0,36±0,04	70,88±9,11 0,27±0,04*
Темная полевка, n=10	39,14±4,23	120,03±20,28 0,31±0,06	80,67±11,63 0,27±0,05*
Красная полевка, n=11	19,33±0,78	41,80±2,9 0,23±0,02	61,83±7,58 0,37±0,04*

Примечание: Масса скоплений жировой ткани выражена двумя способами: в мг – верхний показатель, в % к массе тела – нижний показатель. * - статистически значимые различия с показателем относительной массы пахового жира у лабораторных мышей $p < 0,05$.

3.2. Биохимические показатели жировых тканей свободнообитающих мышевидных грызунов и лабораторных мышей

Не выявлено различий в содержании ДНК, РНК, общего и разобщающего белка UCP1 в буром жире, его обводненности у исследуемых групп свободнообитающих грызунов и лабораторных мышей (табл. 2, рис. 2).

Паховая жировая ткань у всех природных животных характеризовалась повышенным содержанием воды и тканевого белка (табл. 3). Из 5-ти проб пахового жира, использованных при вестерн-блоттинге, полоса разобщающего белка UCP1 определялась в 2-х пробах лабораторных мышей, в 3-х пробах темных полевок и во всех 5-ти пробах восточноазиатских мышей.

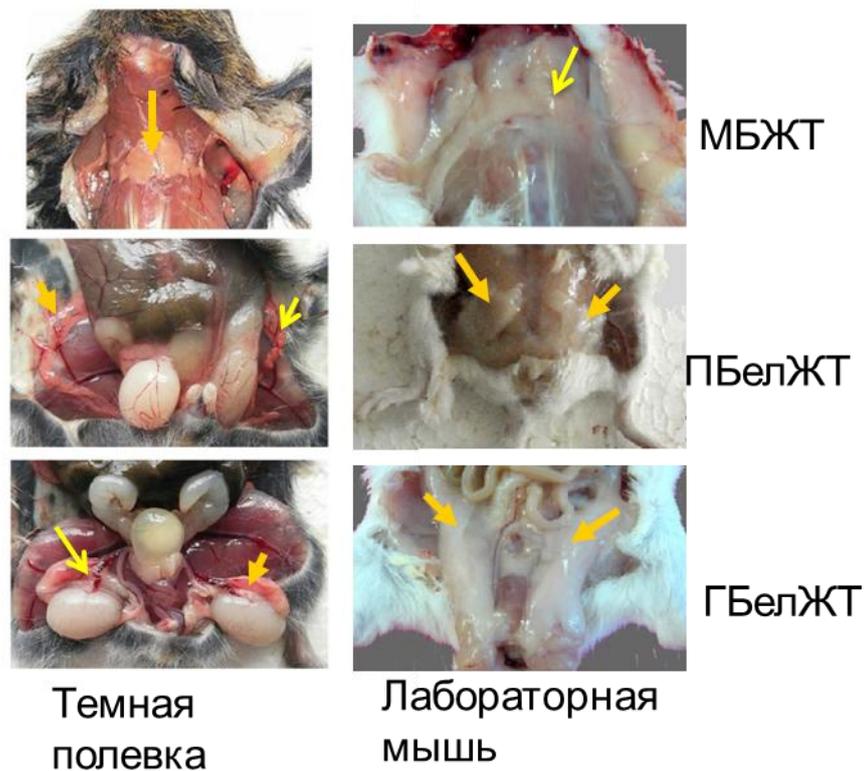


Рис. 1. Особенности морфологии и относительная масса основных скоплений бурой и белой жировых тканей свободнообитающих грызунов и лабораторных мышей

Обозначения: МБЖТ – межлопаточная бурая жировая ткань; ПбелЖ – паховая белая жировая ткань, ГБелЖТ – гонадная белая жировая ткань

При сравнении тех проб, где идентифицирована полоса UCP1, интенсивность полосы, выраженная в усл. ед. на мг тканевого белка, была практически одинаковой в трех изученных группах животных, примерно в 4-5 раз слабее соответствующего показателя для бурого жира (табл.3, рис.2). Таким образом, с учетом повышенного содержания общего тканевого белка в паховом жире у отловленных в природе грызунов, суммарное содержание разобщающего белка в мг пахового жира у них также было выше, чем у лабораторных мышей. Эти факты указывают на высокую окислительную активность митохондрий белой жировой ткани у животных в природных популяциях, более частое присутствие в ней термогенных UCP1-позитивных адипоцитов. Как известно, размеры этих клеток меньше чем размеры зрелых

белых адипоцитов [18]. Вероятно, присутствием UCP1-позитивных адипоцитов можно объяснить тенденцию к повышенному содержанию ДНК (мкг/мг ткани) в пробах пахового жира красной полевки и восточноазиатской мыши. Причем у последней по этому показателю отмечены статистически значимые различия с лабораторными мышами.

При сопоставлении свойств жировых тканей у отловленных в природе грызунов все показатели пахового жира были выше, многие показатели бурого жира проявляли тенденцию к повышенным значениям у восточноазиатской мыши по сравнению с двумя видами полевок.

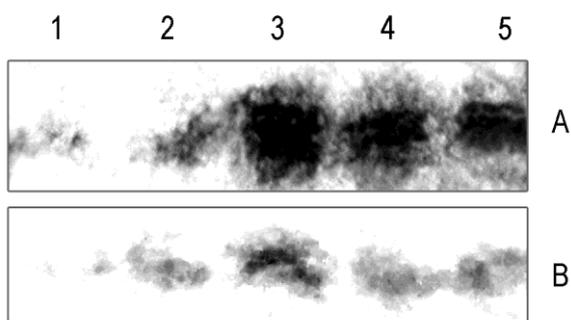


Рис. 2. Разобщающий белок 1 в жировых тканях свободнообитающих грызунов и лабораторных мышей (репрезентативные блоты).

А – блоты пахового жира *A. peninsulae* (1) и *M. agrestis* (2), межлопаточного бурого жира *A. peninsulae* (3), *M. agrestis* (4) и лабораторной мыши (5); В – блоты пахового жира *M. agrestis* (1 и 2), *A. peninsulae* (3 и 4) и лабораторной мыши (5)

Таким образом, в результате проведенного комплексного исследования впервые получены данные о массе, некоторых биохимических показателях белой и бурой жировых тканей у свободнообитающих представителей двух семейств мышевидных грызунов. Сравнительно-видовой анализ показателей отловленных летом серых, лесных полевок и восточноазиатской мыши, а также сопоставление данных этих видов природных грызунов с показателями жировых тканей аутбредных лабораторных мышей *ICR*, не выявило существенных различий по межлопаточному бурому жиру. Паховый белый жир

природных животных по сравнению с лабораторными мышами демонстрирует выраженную метаболическую и термогенную активацию.

Для природной среды даже летом характерны значительные суточные градиенты температур. В период отлова наших животных дневные температуры составляли 18-25°C, а ночные опускались до 10-15°C. Поэтому быстро включающиеся и малоинерционные механизмы терморегуляции, к которым, как раз относят термогенез, летом не менее важны чем в зимний сезон.

Термогенез в UCP1-позитивных клетках пахового жира может обеспечивать быстрый разогрев мышц нижних конечностей, что важно для животных с летней активностью в прохладные ночные часы, когда к тому же теплопотери могут дополнительно увеличиваться из-за выпадения росы. Обнаруженный нами факт более высокой окислительной активности пахового жира, более высокой встречаемости в нем белка UCP1 у восточноазиатской мыши согласуется с этим предположением, если учесть описанные в литературе наблюдения о характерной для мышей большей подвижности, их перемещениям на относительно дальние расстояния от убежища по сравнению с полевками [11]. Дальнейшие исследования прояснят детальнее роль термогенных жировых тканей в адаптивных стратегиях мышей и полевок.

Термогенная активация UCP1-позитивных адипоцитов в депо белого жира в лабораторном эксперименте сдерживает энергодепонирование и гипертрофию белых адипоцитов [23]. Сравнительный анализ содержания ДНК в паховом жире восточноазиатской мыши и лабораторных мышей указывает на уменьшенный средний клеточный размер в жировых депо природных мышей. Наряду с термогенной активацией белого жира, у свободнообитающих животных низкая калорийность природных кормов, укорочение времени

Таблица 2

Биохимические показатели межлопаточного бурого жира лабораторных мышей и свободнообитающих грызунов

Животные	ДНК, мкг/мг	РНК, мкг/мг	Общий белок, мкг/мг	Белок UCP1, усл.ед./мкг белка	Вода, мкг/мг
Лабораторные мыши <i>ICR</i> , n=10	0,48±0,08	0,57±0,10	58,69±6,10	89,28±9,80 (5)	339,4±15,5
Восточноазиатская мышь, n=7	0,53±0,09	0,41±0,02	60,60±5,62	153,71±32,20 (5)	440,1±39,5
Темная полевка, n=6	0,39±0,04	0,47±0,04	52,33±8,67	94,58±11,42 (5)	340,6±40,2
Красная полевка, n=7	0,46±0,09	0,43±0,11	63,96±16,01		270,1±59,2

Таблица 3

Биохимические показатели паховой белой жировой ткани лабораторных мышей и свободнообитающих грызунов

№	Животные	ДНК, мкг/мг	РНК, мкг/мг	Общий белок, мкг/мг	Белок UCP1, усл.ед./мкг белка	Вода, мкг/мг
1	Лабораторные мыши <i>ICR</i> , n=10	0,21±0,04 ²	0,22±0,03	11,22±0,19	18,68 (2)	110,0±9,8
2	Восточноазиатская мышь, n=7	0,54±0,05 ^{1,3}	0,40±0,04 ¹	60,49±6,46 ^{1,3,4}	29,45±5,86 (3)	320,7±30,7 ^{1,4}
3	Темная полевка, n=6	0,23±0,04 ²	0,29±0,05	25,13±6,05 ^{1,2}	21,27±2,88 (3)	220,5±30,1 ¹
4	Красная полевка, n=7	0,37±0,08	0,20±0,05	29,87±6,60 ^{1,2}		180,3±12,4 ^{1,2}

Примечание: Верхние индексы указывают номера группы животных, с показателем которых имеется статистически значимое различие, $p < 0,05$. При расчете содержания белка UCP1 учитывались только блоты, где идентифицировалась полоса этого белка; их количество указано в круглых скобках.

питания из-за присутствия хищников, пресс паразитов, по-видимому, также вносят вклад в выраженную редукцию депо белого жира, в сдерживание роста адипоцитов до «критического размера», запускающего клеточную гибель и развитие инсулинорезистентности [11, 18]. Таким образом, животные из природных популяций дополнительно к лабораторным линиям являются интересными и информативными объектами в сравнительной и экологической физиологии энергообмена и метаболизма, в исследованиях патогенеза метаболического синдрома.

В соответствие с перспективными направлениями дальнейших исследований была разработана тематика школьных исследовательских работ.

➤ Сравнительный анализ морфометрических и биохимических свойств жировых тканей у домашней мыши (*Mus Musculus*) и аутбредных лабораторных мышей.

Будут определены масса межлопаточного и околощитовидного бурого жира, масса окологонадной и ретроперитонеальной белой жировых тканей, их цвет, содержание ДНК и РНК в них у лабораторных мышей и домовых мышей.

➤ Сравнительный анализ жировых тканей у представителей сем *Muridae* и *Cricetidae*.

Планируется сравнительный анатомо-морфологический анализ, определение общего белка, нуклеиновых кислот в буром и бежевом абдоминальном и паховом жире у полевой мыши и у узкочерепной полевки.

➤ Сезонная динамика массы, термогенных свойств жировых тканей у свободнообитающих животных.

Морфометрический анализ сезонной динамики жировых тканей будет проведен у узкочерепной полевки. Выбор этого вида грызунов связан с легкостью отлова. Этот вид ведет колониальный образ жизни, повсеместно распространен в окрестности Красноярска.

ГЛАВА 4. УЧАСТИЕ СТАРШЕКЛАССНИКОВ В СРАВНИТЕЛЬНО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ СВОБОДНОБИТАЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

4.1. Общие принципы организации исследовательской деятельности учащегося.

Исследовательская деятельность – важная составляющая современного образовательного процесса, наиболее действенное средство формирования научного мировоззрения школьника [5]. Для отдельных учащихся профильных классов исследовательская деятельность при вузовской или академической лаборатории представляет первые шаги на пути к карьере ученого.

В результате исследовательской деятельности происходит активизация личностной позиции учащегося на основе самостоятельно приобретенных знаний, развитие исследовательского типа мышления. Такой вид деятельности помогает более осознанно усваивать полученные знания, приучает их к самостоятельности, а также делает учеников более ответственными и в какой – то степени более «взрослыми». Исследовательская деятельность учащихся в данный момент достаточно актуальна в современной педагогике, так как позволяет развивать УУД учеников. Главной целью исследования является развитие личности учащегося, его творческих способностей, а также освоение новых видов деятельности в любой культурной сфере [12].

Во время исследования, определённую специфику также несет деятельность ученика и учителя [3]. Деятельность ученика в основном выражена в реализации научного способа познания на материале различных областей знаний. Юному исследователю необходимо выполнить ряд важных задач, таких как выработка гипотезы, постановка проблемы, планирование учебных действий, проверка гипотезы на практических работах, обработка результатов и конечно же формулировка выводов. Роль наставника в данном случае выполняет педагог или учитель. Он управляет процессом овладения способами приобретения новых знаний, направляет и консультирует в умении

практически использовать полученные знания, координирует учащихся в поисках нужной информации.

Для того, чтобы овладеть навыками исследовательской деятельности необходимо, чтобы старшеклассники обладали системой базовых знаний (в первую очередь, понятийного аппарата исследования, сущности исследовательского процесса) и принимали непосредственное участие в исследовательской работе. Реализация первого этапа такой работы по получению базовых знаний можно реализовать через самостоятельную работу учащихся с помощью реферирования и аннотирования литературы. Осуществлять второй этап необходимо через реализацию базовых знаний в процессе исследовательской деятельности. Можно сделать вывод, что исследовательская деятельность учащихся способствует достижению одной из важнейших целей образования – научить детей мыслить самостоятельно, уметь ставить и решать проблемы, привлекая при этом знания из различных областей науки.

Заинтересовывать детей наукой необходимо именно со школы, начиная с младших школьников, оказать им помощь в развитии своих способностей, воплотить в жизнь их планы и мечты [5]. Известно, что ребенок в раннем возрасте является по своей природе исследователем. Соответственно в данном случае главная задача педагога – правильно и рационально организовать активность учащегося, воспитать из любопытного младшего школьника любознательного ученика среднего звена, что будет составлять первичную основу для будущей исследовательской деятельности старшеклассника.

В ходе исследовательской работы развиваются такие важные умения как обработка информации, осуществление поиска дополнительных сведений в различных источниках, постановка и формулировка проблемы. Кроме этого исследовательская работа способствует развитию таких важных мыслительных операций как анализ, синтез, обобщение, выделение главных мыслей в тексте, умение делать выводы, и особенно формированию специфического научного типа мышления, научных представлений о ключевых понятиях, методах и

приемах работы. Не менее важно для учащегося грамотно составлять план своей работы, организовывать деятельность и проводить рефлексию. Учащиеся, занимающиеся исследовательской работой, обладают такими личностными качествами, как ответственность, любознательность, целеустремленность и терпение, а также обладают более высоким терпением и трудолюбием. В результате в процессе работы решаются следующие задачи: происходит развитие креативности и критического мышления, навыков мыслительной деятельности, развивается самостоятельность при работе со специальной литературой и методами научного исследования, продолжает формироваться абстрактное мышление [12].

Получение первых результатов по проекту, их представление, и конечно же, последующая защита являются одним из важных этапов исследовательской деятельности. Поэтому учащемуся необходимо владеть разными видами речевой деятельности: умением общаться с аудиторией, способностью формировать и уметь отстаивать свое мнение, воспитать уверенность в своем деле и сознания значимости выполненной работы.

В процессе исследовательской работы реализуются следующие этапы, характерные для научного исследования:

1. Выбор темы исследования;
2. Составление плана исследования;
3. Работа с литературой;
4. Выбор методов исследования;
5. Проведение исследования;
6. Обработка результатов исследования

По продолжительности работа является долгосрочной, выполняется индивидуально, во внеурочное время в течение всего учебного года.

4.2. Разработка материалов и основных этапов исследовательской работы учащегося

В 2016-2017 учебном году на базе ФБГХ началась реализация проекта «Юный естествоиспытатель», направленного на погружение старшеклассников, ориентированных к углубленному изучению дисциплин естественно - научного цикла, в вузовскую среду. Школьники 10 «С» класса лицея №1 г. Красноярска прикреплялись к научным руководителям из числа сотрудников и студентов факультета и еженедельно в течение одного дня занимались выполнением предложенных им научно-исследовательских проектов. Руководствуясь общими положениями организации работы школьников, нами были подготовлены: пояснительная записка к работе, список дополнительной учебной, научной и научно-популярной литературы, примерный календарный план работы, инструкции с пошаговым описанием используемых методов.

В пояснительной записке кратко охарактеризованы основные проблемы физиологии энергообмена, энергодепонирования, сравнительной физиологии жировых тканей.

Пояснительная записка к исследовательской работе «Сравнительная характеристика жировых тканей грызунов из природных популяций и лабораторных мышей»

Жировым тканям принадлежит центральная роль в поддержании энергетического и метаболического гомеостаза. Избытки энергетических субстратов депонируются в белой жировой ткани, для обеспечения активности животных и человека в периоды недостаточности пищевых ресурсов, а у современного человека предотвращая риск их патологического использования с развитием таких заболеваний как атеросклероз, сахарный диабет 2-го типа. Теплопродукция в бурой жировой ткани поддерживает постоянную, оптимальную для клеток организма температуру тела. В последние годы список потенциальных термогенных эффекторов расширился за счет бежевой жировой

ткани. Бежевые адипоциты, как и бурые адипоциты, содержат термогенные митохондрии, но локализованы в депо белого жира. Сведения об их функциях и термогенных свойствах неоднозначны. Одним из подходов к выяснению функций этих клеток, их роли в адаптивных стратегиях может быть наблюдение за динамикой бежевого жира у животных в природных популяциях.

Цель работы - анатомо-морфологическая характеристика жировых тканей свободнообитающих грызунов в сравнении с лабораторными мышами.

Для ее реализации требуется:

1. Подготовить аналитический обзор литературы
2. Освоить методы препарирования, выделения и анатомо-морфологической характеристики БЖТ и БелЖТ
3. Провести анатомо-морфологический анализ жировых тканей лабораторных мышей (n=8), восточно - азиатских мышей (n=4), темных полевков (n=5)
4. Подведение итогов и формирование конечных выводов

Работа выполняется на базе лаборатории биохимии и физиологии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева и является частью совместного научно-исследовательского проекта КГПУ и КрасГМУ. Будут исследоваться жировые ткани лабораторных мышей линии ICR и отловленных в окрестностях Красноярска грызунов, относящихся к родам: серые полевки (*Microtus*), лесные полевки (*Clethrionomys*), лесные и полевые мыши (*Apodemus*), домовые мыши (*Mus musculus*).

По результатам знакомства учащихся с темами будущих работ, пояснительными записками, примерными календарными планами исследовательских работ на организационном семинаре работа по теме «Сравнительная физиология жировых тканей» была выбрана Козловой Марией.

Свой выбор Мария мотивировала в дальнейшем связать свою жизнь с профессией эколога. План работы учащейся представлен в таблице 4.

Таблица 4

Календарный план работы обучающейся Козловой М.А. на 2016-2017 г

Сроки	Реализация	Конкретный продукт
Сентябрь	Выбор наиболее актуальной, а также интересной и занимательной для ученицы темы будущего исследования.	Выбрана тема, составлено резюме проекта
Октябрь	Составление подробного плана исследования с основными инструкциями по выполнению работы.	План исследования
Ноябрь - декабрь	Подготовка литературы различного уровня, для более полного погружения в проблему исследования; проведение консультации и более тщательное обсуждение интересующего вопроса и последующее его решение.	Конспекты, терминологический словарь.
Январь	Выбор методов, наиболее простых в понимании и усвоении, а также актуальных и наиболее подходящих для данного исследования.	Составление инструкции выполнения эксперимента
Февраль	Проведение исследования, используя необходимые экспериментальные методики.	Приобретение навыков экспериментальной работы, протоколирование данных, получение

		результатов
Март	Обработка результатов, полученных в ходе эксперимента. Подведение итогов и формирование конечных выводов.	Статистическая обработка результатов, подтверждение гипотезы.
Апрель	Оформление полученных результатов	Формулировка выводов по работе; Подготовка презентации, материалов: иллюстраций и рисунков
Май	Подготовка к конференции	Написание и предварительное заслушивание доклада

Для углубления знаний учащейся по теме работы был предложен список литературы. Учащаяся должна, работая с литературой, подготовить краткие конспекты, составить терминологический словарь. В связи с обилием в предлагаемой литературе новых научных терминов учащейся рекомендовано попробовать сначала самой найти их содержание, пользуясь поисковыми интернет ресурсами, при возникновении сложностей в понимании обращаться к руководителю.

Список литературы

- Елсукова, Е.И. Новый тип термогенных адипоцитов: происхождение, свойства, функции / Е.И. Елсукова, Л.Н. Медведев // В мире научных открытий. – 2016. – №8. – С.97-126.

- Иванов, К.П. Современные медицинские проблемы энергообмена человека / К.П. Иванов // Вестник РАМН. 2013. Т.68. DOI: <http://dx.doi.org/10.15690/vramn.v68i6.674>
- Кондратенко Ю. У животных, впадающих в спячку, нервные клетки обогреваются белком термогенином. / Ю. Кондратенко // http://elementy.ru/novosti_nauki/432400/
- Резник, Н. Любовный жар миноги / Н. Резник // http://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432092
- Сафронов, В.М. Адаптивные особенности терморегуляции и поддержания энергетического баланса у мышевидных грызунов / А. Сафронов // Вестник ТГУ. – 2009. - №4. С. 47-61.
- Стасевич К. Жир белый, бурый, бежевый / К. Стасевич // Наука и жизнь. - 2014. - №11. С. 20-26.
- Терешина Е.В. Возрастная дисфункция жировой ткани / Терешина Е.В.// Геронтология и гериатрия. – 2010. - Вып. 5 . - С. 98-101.

Следующий этап особенно важен, так как включает освоение необходимых методов. Чтобы облегчить выполнение этой задачи, чтобы снизить риск экспериментальных ошибок предварительно учащаяся была ознакомлена с инструкциями. Текст инструкции приведен ниже.

Инструкции к выполнению работы

Физиологический эксперимент – это целенаправленное вмешательство в организм с целью выяснить функцию той или иной его структуры и механизм ее реализации. Неотъемлемым атрибутом данной исследовательской работы является препаровальный набор инструментов, включающий: пинцет, ножницы, препаровальные дощечки, иглы для фиксации тушки и т.д.

Прежде, чем начать непосредственно препарирование необходимо произвести основные замеры животного, которые в дальнейшем потребуются в расчетах

относительной массы жировых скоплений. Это оценка таких параметров как: длина тела (замер производится от кончика носа, до анального отверстия), длина хвоста (замер производится от анального отверстия до кончика хвоста), вес животного (с помощью аналитических весов).

Методика препарирования.

- 1) Надеть халат, перчатки и начать подготовку рабочего места.
- 2) Максимально освободить рабочую поверхность от посторонних предметов.
- 3) Проверить аналитические весы, если необходимо провести калибровку.
- 4) Разместить инструменты препаровального набора на рабочем столе максимально доступно и удобно, а также проверить наличие тетради для записей в ходе эксперимента.
- 5) Закрепить тело животного при помощи иголок так, чтобы живот был расположен на препаровальной дощечке.
- 6) При помощи пинцета оттянуть кожу и сделать небольшой надрез в области лопаток, с помощью ножниц.
- 7) Произвести разрез кожного покрова со стороны спины мыши, от шейного отдела позвоночника до хвоста.
- 8) С помощью пинцета растягивают кожу в стороны и аккуратно подрезают ножницами, удаляя при этом соединительную ткань и лишнюю кожу, для того, чтобы добраться до межлопаточного скопления бурой жировой ткани и произвести ее визуальную оценку. Необходимо оценить цвет ткани, ее плотность, а также присутствует ли другая разновидность жира, наряду с уже имеющейся.
- 9) Извлечь жировую ткань, снова провести визуальную оценку и произвести взвешивание.
- 10) Приготовить гомогенаты из полученной ткани, так как она может пригодиться для каких – либо дальнейших исследований.

11) Затем, необходимо перевернуть тело мыши на спину и произвести надрез от области шеи до паховой области включительно (также необходимо воспользоваться пинцетом для того, чтобы сделать необходимую жировую ткань более доступной для визуальной оценки - это белая паховая жировая ткань и окологонадное скопление белой жировой ткани).

12) Далее необходимо извлечь нужные ткани, измерить их массу и также произвести более тщательную визуальную оценку. В частности это необходимо для определения принадлежности жировой ткани к той или иной разновидности: бурая жировая ткань (БЖТ), белая жировая ткань (БелЖТ) и бежевая жировая ткань (БежЖТ).

13) У полученных тканей, в дальнейшем, еще можно определить достаточно много различных показателей, поэтому после извлечения их необходимо подвергнуть заморозке, для того чтобы избежать дальнейшего окисления и не потерять биологическую и экспериментальную ценность.

Примечание: локализация, цветовая гамма, объем, масса и другие параметры скопления бурой или белой жировой ткани для каждой особи строго индивидуальны.

Анализ работы обучающегося

Мария относилась к работе увлеченно. К предложенному списку литературы Маша добавила найденные ей самостоятельно на известных научно-популярных сайтах (Биомолекула.ru, elementy.ru) источники. Маша кроме выделенного для школьников времени задерживалась в лаборатории до конца рабочего дня, оказала большую помощь в уходе за лабораторными мышами. При выполнении своей части работы девочка проявила такие качества как настойчивость, внимательность и аккуратность, самостоятельность. Кроме препарирования освоила метод гомогенизации жировых тканей, участвовала в определении нуклеиновых кислот. Девочка

относительно легко освоила элементарный статистический анализ данных в программной среде Microsoft Excel, самостоятельно подготовила иллюстративный материал к докладу. По итогам проекта на конференции «Молодежь и наука» ее работа вызвала очень большой резонанс. Было задано очень много вопросов по теме доклада. Мария ответила практически на все вопросы товарищей и комиссии, используя как литературные, так и собственные данные, легко вступает в дискуссии по теме своей работы.

Результаты исследовательской работы представлены: на школьной конференции в МАОУ «Лицей №1» (14.02.2017); на XVIII Международном научно-практическом форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (27.04.2017). В следующем учебном году Мария собирается продолжить работу по избранной теме, надеется представить результаты на школьной секции студенческой конференции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты предварительных исследований морфо-анатомических и биохимических свойств бурого и белого жира природных грызунов и лабораторных мышей новы, согласуются с гипотезой об участии термогенеза нового бежевого типа адипоцитов в адаптивных стратегиях животных. Продолжение их актуально для развития фундаментальной концепции эволюции эндотермии, представлений о механизмах популяционного гомеостаза. Понимание физиологических механизмов, обеспечивающих на популяционном уровне динамику численности популяций грызунов разных видов имеет и прикладной интерес для лесного и сельского хозяйства, для эпидемиологии и др.

В концепции долгосрочного развития РАН отмечается важность привлечения старшеклассников в научные лаборатории, формирования конгломератов: малая школьная академия, ВУЗ, аспирантура, научное подразделение [7]. Роль научных, учебно-исследовательских вузовских лабораторий заключается в том, чтобы препятствовать превращению уже ставшего массовым проектно-исследовательского движения школьников в непродуктивную игру, в мероприятия, «проводимые для галочки», всемерно способствовать развитию научного мировоззрения, воспитывать с одной стороны критическое, с другой творческое отношение к накопленным и новым знаниям и фактам.

Наш опыт работы подтверждает эффективность привлечения старшеклассника в качестве равноправного члена в научный студенческий коллектив. Комплексный характер любого научного исследования, неизбежные среди участников исследования обсуждения и дискуссии не только показывают ребенку увлекательность, сложности научного поиска, но и демонстрируют недостаток знаний, который необходимо преодолеть для успешного участия в проекте. Разработанные материалы к исследовательской работе помогают школьнику справиться с неизбежными трудностями, легко адаптироваться в

лаборатории, не отстать от учебного процесса, показывают слабые стороны его школьных знаний, стимулируют его учебную деятельность в школе.

Дополнительным средством активизации мыслительной деятельности, мотивации к чтению научно-популярной литературы по тематике своей исследовательской работы может быть научно-методологический семинар, проводимый совместно студентами – тьюторами и школьниками. Тематика семинаров может быть связана с обсуждением интересных научных и научно-популярных статей, с обсуждением методических проблем, уже полученных результатов.

ВЫВОДЫ

1. Метаболические, термогенные свойства жировых тканей в основном изучались у лабораторных мышей и крыс. Неоднозначность литературных данных о функциях нового бежевого типа адипоцитов вызывает необходимость расширить исследования на животных из природных популяций

2. Подобраны анатомо-морфологические и биохимические методы оценки обменных процессов жировых тканей грызунов из природных популяций. Цветовая гамма жировых тканей, их обводненность косвенно указывают на митохондриогенез и окислительную активность в них. Определение разобщающего белка отражает термогенный потенциал, а содержание общего белка и нуклеиновых кислот - интенсивность пластического обмена.

3. У мышевидных грызунов, отловленных летом из природных популяций основные депо белой жировой ткани значительно редуцированы, имеют темные оттенки цвета, повышенное содержание белка, ДНК и воды, разобщающий белок 1 регистрировался чаще, а интенсивность его полосы при блоттинге была выше по сравнению с лабораторными животными. Различия в свойствах бурого жира между природными и лабораторными грызунами не выявлены.

4. В рамках проекта «Сравнительная физиология жировых тканей» разработана тематика научно-исследовательских работ школьников, подготовлены организационные материалы: пояснительная записка, календарный план, список литературы, инструкции к проведению эксперимента, проведена апробация работы «Сравнительная характеристика жировых тканей грызунов из природных популяций и лабораторных мышей»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елсукова, Е. И. Морфология бурой жировой ткани у самок узкочерепной полевки (*Microtus gregalis*) в природной популяции / Е. И. Елсукова, Е.В. Екимов, О.В. Мизонова, Е.Ю. Екимова // Зоологический журнал. - 2010. - Т.89. - С.620-624.
2. Елсукова, Е.И. Новый тип термогенных адипоцитов: происхождение, свойства, функции / Е.И. Елсукова, Л.Н. Медведев // В мире научных открытий. – 2016. – №8. – С.97-126.
3. Ермилин, А.И. Культурные и педагогические ресурсы тьюторства в дополнительном научном образовании школьников / А.И. Ермилин, Е.В. Ермилина // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=13277>
4. Иванов, К.П. Современные медицинские проблемы энергообмена человека / К.П. Иванов // Вестник РАМН. 2013. Т.68. DOI: <http://dx.doi.org/10.15690/vramn.v68i6.674>
5. Кельсина, А.С. Исследовательская деятельность школьников как одно из основных направлений работы научно-образовательного центра ИСЭРТ РАН /А.С. Кельсина // Современные научные исследования и инновации. - 2012. № 5 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2012/05/>
6. Кондратенко Ю. У животных, впадающих в спячку, нервные клетки обогреваются белком термогенином. / Ю. Кондратенко // http://elementy.ru/novosti_nauki/432400/
7. Концепция развития Российской академии наук до 2025 г. Проект к заседанию Президиума РАН 24 сентября 2013 г. // http://edu.inesnet.ru/wp-content/uploads/2013/10/The_concept_of_development_RAN_sent_2013.pdf
8. Медведев, Л. Н. Бурая жировая ткань: молекулярно – клеточные основы регулируемого термогенеза. / Л.Н. Медведев, Е.И. Елсукова // Красноярск: Изд – во «Амальгама» - 2002. – 528 с.

9. Мизонова, О. В. Энергообмен и биохимические особенности жировых тканей мышц линии ICR в условиях продолжительного ограничения питания. / О.В. Мизонова, Е.И. Елсукова, Л.Н. Медведев // Бюл. exper. биол. и мед. - 2013. - Т.155, № 6. - С.706-709.
10. Резник, Н. Любовный жар миноги / Н. Резник // http://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/432092
11. Сафронов, В.М. Адаптивные особенности терморегуляции и поддержания энергетического баланса у мышевидных грызунов / А. Сафронов // Вестник ТГУ. – 2009. - №4. С. 47-61.
12. Семенов, С.Е. Исследовательская деятельность школьников в лучших школах мира и России / С. Семенов // <http://chem-teacher.ru/?p=2174>
13. Стасевич К. Жир белый, бурый, бежевый / К. Стасевич // Наука и жизнь. - 2014. - №11. С. 20-26.
14. Терешина Е.В. Возрастная дисфункция жировой ткани / Терешина Е.В.// Геронтология и гериатрия. – 2010. - Вып. 5 . - С. 98-101.
15. Трудолюбова, М.Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 313–316.
16. Bai, Z. Intermittent cold exposure results in visceral adipose tissue "browning" in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) / Z. Bai, T. Wuren, S. Liu, S. Han, L. Chen, D. McClain, R.L. Ge // *Comp. Biochem. Physiol.* - 2015. - Vol. 184A. - P. 171-178.
17. Bonda-Ostaszewska, E. Seasonal and photoperiodic effects on lipid droplet size and lipid peroxidation in the brown adipose tissue of bank voles (*Myodes glareolus*) / E. Bonda-Ostaszewska, T. Wtostowski, A. Krasowska, P. Kozlowski // *Acta theriol.* - 2012. - Vol.57. – P. 289-294
18. Elsukova, E.I. Physiological features of perigonadal adipose tissue containing uncoupling protein UCP1 in ICR mice. / E.I. Elsukova, L.N. Medvedev, O.V. Mizonova // *Bull. Exp. Bio. Med.* - 2016. - Vol. 161. - P. 347-350.
19. Cinti, S. The adipose organ at a glance. // *Disease Models Mechanisms.* – 2012. - Vol. 5. - P. 588-594.

20. Fisher, F.M. Stress heats up the adipocyte. / F.M. Fisher, E. Maratos-Flier // Nat. Med. - 2013. - Vol. 630, - P. 17-18.
21. Keipert, S. Brite/beige fat and UCP1 – is it thermogenesis? /S. Keipert, M. Jastroch // Biochim. Biophys. Acta. - 2014. - Vol. 1837. - P. 1075-1082.
22. Klaus, S. Seasonal acclimation of bank voles and wood mice: nonshivering thermogenesis and thermogenic properties of brown adipose tissue mitochondria. / S. Klaus, G. Heldmaier, D. Ricquier // J Comp Physiol B. – 1988. – Vol. 158. – P. 157-164.
23. Kozak, L.P. Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans / L.P. Kozak, R. Koza, R. Anunciado-Koza // International J Obesity. - 2010. – Vol.34. – P. 523-527.
24. Li, Y. White, brite, and brown adipocytes: the evolution and heater organ in mammals / Y. Li, D. Lasar, T. Fromme, M. Klingenspor // Canadian J. Zoology. – 2014. – Vol.92. P.615-626.
25. Li, Q. Cold adaptive thermogenesis in small mammals from different geographical zones of China / Q.Li, R.Sun, C.Huang, Z.Wang, X.Liu, J. Hou, J.Liu, L.Cai, N.Li, S.Zhang, Y.Wang // Comparative Biochemistry and physiology. – 2001. Vol.129. P. 949-961.
26. Liu, J. Thermogenic properties in three rodent species from Northeastern China in summer. / J.Liu, R. Sun, D-H. Wang //J Thermal biology. 2006. Vol.31. P.172-176.
27. McDevitt R.M., Long photophase is not a sufficient stimulus to reduce thermogenic capacity in winter-acclimatized short-tailed field voles (*Microtus agrestis*) during long-term cold acclimation / R.M. McDevitt, J.R. Speakman // J. Comp. Physiol. B. – 1994. – Vol.164. P.159-164.
28. Nedergaard, J. The browning of white adipose tissue: some burning issues. / J. Nedergaard, B. Cannon // Cell Metab. - 2014. - Vol. 20. - P. 396-407.
29. Oelkrug, R. Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution. / R. Oelkrug, N. Goetze, C. Exner, Y. Lee, G.K. Ganjam, M. Kutschke, S. Muller, S. Stohr, M.H. Tscho, P.G. Crichton, G. Heldmaier, M. Jastroch, C. Meyer // Nat. Commun. - 2013. - Vol. 4. - doi: 10.1038/ncomms3140

30. Perrot-Sinal, T.S. Plasma testosterone levels are related to various aspects of locomotor activity in wild-caught male meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). / T.S. Perrot-Sinal, D. Innes, M. Kavaliers, K.P. Ossenkopp // *Physiol. Behav.* - 1998. - Vol. 64. - P. 31-36.
31. Rosen, E.D., What we talk about when we talk about fat? / E.D. Rosen, B.M. Spiegelman B.M. // *Cell* – 2014 - Vol. 156. - P. 20-44.
32. Wang, J. Seasonal regulations of energetics, serum concentrations of leptin, and uncoupling protein content of brown adipose tissue in root voles (*Microtus oeconomys*) from the Qinghai-Tibetan plateau / J. Wang, Y. Zhang, D. Wang // *J. Comp. Physiol. B.* – 2006. – Vol. 6. – P.240-249.
33. Wang, Y. The great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*) as a good model for cold-induced browning of intra-abdominal white adipose tissue. / Y. Wang, T. Zhu, S. Ke, N. Fang, D. Irwin, M. Lei, J. Zhang, H. Shi, S. Zhang, Z. Wang // *Plos One.* - 2014. - Vol. 9: e112495. doi: 10.1371/journal.pone.0112495.
34. Wu, J. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown. / J. Wu, P. Cohen, B. M. Spiegelman // *Genes Dev.* - 2013. - Vol. 27. - P. 234-250.
35. Wu, L. Regeneration of Articular Cartilage by Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells: Perspectives From Stem Cell Biology and Molecular Medicine. / L. Wu, X. Cai, S. Zhang, Y. Lin // *Journal of Cellular Physiology.* – 2013. – Vol.5. – P. 938-944.
36. Zhang, C. Regulation of Microvascular Function by Adipose Tissue in Obesity and Type 2 Diabetes: Evidence of an Adipose - Vascular Loop. / H. Zhang, C. Zhang // *American Journal of Biomedical Sciences.* – 2009. – Vol.2. – P. 133-142.
37. Zhang, Y. Stromal Progenitor Cells from Endogenous Adipose Tissue Contribute to Pericytes and Adipocytes That Populate the Tumor Microenvironment. / Y. Zhang, A.C. Daquinag, F. Amaya-Manzanares, O. Sirin, C. Tseng, M. G. Kolonin // *Cancer Research.* – 2012. – Vol.72. – P. 5198-5209.
38. Zhu, W. Adipose and mammary epithelial tissue engineering. / W. Zhu, C.M. Nelson // *Biomatter.* – 2013. – Vol.3. - doi: [10.4161/biom.24630](https://doi.org/10.4161/biom.24630)

39. Zhu, W. Seasonal variations of body mass, thermogenesis and digestive tract morphology in *Apodemus chevrieri* in Hengduan mountain region / W. Zhu, S Yang, L.Zhang, Z.Wang // *Animal biology*. – 2012. - Vol. 62. – P. 463-478.
40. Zuk, PA. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D.A. De Ugarte, J.I. Huang, H. Mizuno, Z.C. Alfonso, J.K. Fraser, P. Benhaim, M.H. Hedrick // *Mol Biol Cell*. – 2002. – Vol.13. – P. 4279-4295.

Тезисы доклада Козловой М. на XVIII Международном научно-практическом форуме студентов, аспирантов и молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»

Локализация основных скоплений белой и бурой жировых тканей у свободнообитающих грызунов близка к таковой у лабораторных мышей. Основные запасы белой жировой ткани сосредоточены в подкожном и абдоминальном жировых депо. Обращает внимание выраженная редукция как общего количества белой жировой ткани так и по отдельным депо, несмотря на летнее обилие кормов. Эта закономерность менее проявляется в отношении пахового жира и особенно выражена в отношении окологонадного жира. Бурая жировая ткань представлена крупным парным межлопаточным скоплением, подмышечным бурым жиром, полосками шейного жира, залегающего между мышечными слоями, околотитовидным скоплением, залегающим между долями щитовидной железы. Содержание бурого жира оценивалось по массе более компактного и легко выделяемого межлопаточного скопления. В отличие от белой жировой ткани количество бурого жира у летних животных практически не отличается от лабораторных мышей.

Можно отметить чаще встречающийся более темный вариант окраски скоплений бурого жира, отражающий его повышенную термогенную активность, у диких животных по сравнению с лабораторными мышами. При сравнении окраски бурого жира у представителей разных родов – наиболее темные оттенки выявляются у более мелких грызунов - красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) и особенно у восточноазиатской мыши (*Apodemus peninsulae*), что можно объяснить большими теплопотерями и в связи с этим более активной теплопродукцией.

Кроме того, у взрослых половозрелых лабораторных мышей часто островки бурого жира прикрыты сверху хорошо развитой белой жировой тканью, в то время как у свободнообитающих грызунов этой слой белого жира практически всегда отсутствует.

Белая паховая жировая ткань у значительной части животных имела темные оттенки, в основном темно-розовую окраску, что, по-видимому, указывает на содержание в ней бежевых адипоцитов.

Проведенное морфо-анатомическое исследование свидетельствует о повышенной термогенной активности бурого жира и, вероятно, пахового жира у свободнообитающих грызунов по сравнению с лабораторными животными. Причина этого – в контрастных по температуре условиях естественной среды, когда ночные температуры могут даже летом быть существенно ниже дневных. В этих условиях малоинерционный быстро включающийся термогенный механизм жировых тканей не менее важен, чем зимой МБЖТ подогревает мышцы спины, бежевые адипоциты пахового белого жира подогревают мышцы нижних конечностей и живота, поддерживая высокую активность этих животных в прохладные ночные часы.