

МИНИСТЕРСТВО ПРОСВЕЩЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
им. В.П. Астафьева

Факультет биологии, географии и химии

Кафедра биологии, химии и экологии

Гусева Евгения Константиновна
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
**ПРОЕКТ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ «БЕЛКОВЫЙ
ПАСПОРТ АДИПОЗНОГО ОРГАНА» В ПРОФИЛЬНЫХ
ЕСТЕСТВЕННОНАУЧНЫХ КЛАССАХ СТАРШЕЙ ШКОЛЫ.**

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование (с двумя
профилями).

Направленность (профиль) образовательной программы биология и химия

ДОПУСКАЮ К ЗАЩИТЕ

Зав. кафедрой: д.б.н, профессор

Антипова Е.М. _____
(дата, подпись)

Руководитель: к.б.н, доцент

Елсукова Е.И. _____
(дата, подпись)

Дата защиты 29.06.2020г.

Обучающийся: Гусева Е.К.

(дата, подпись)

Оценка _____

Красноярск, 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМАТИКЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ.....	6
1.1. Концепция адипозного органа. Анатомо-морфологические и физиологические особенности представленных в нем жировых тканей.....	6
1.2. Возрастные изменения жировых тканей.....	12
1.3. Современные методы протеомного анализа.....	13
1.4. Протеом адипозного органа	15
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	17
2.1. Экспериментальные животные.....	17
2.2. Выделение жировых тканей.....	17
2.3. Определение тканевого белка по методу Лоури.....	17
2.4. Разделение клеточных белков с помощью ПААГ электрофореза.....	19
2.4.1. Реактивы и оборудование.....	20
2.4.2. Этапы ПААГ электрофореза.....	20
2.5. Компьютерный анализ ПААГ гелей в программе GelAnalyzer.....	21
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
3.1. Масса жировых тканей и содержание в них общего белка при старении лабораторных мышей.....	22
3.2. Состав белков в бурой и белой жировых тканях мышей разного возраста.....	24

ГЛАВА 4. ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЕГО 10КЛАССА.....	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	41
Приложение А. Теоретические основы ПААГ белкового электрофореза.....	41
Приложение Б. Пошаговая инструкция подготовки камер для гелей.....	42
Приложение В. Иллюстрированное руководство «Белковый электрофорез»....	43
Приложение Г. Тезисы доклада Франц Ксении Алексеевны на школьном этапе конференции «Научный потенциал Сибири» на базе МАОУ «Средняя школа №153».....	44
Приложение Д. Опубликованные научные статьи по теме исследования.....	48

СОГЛАСИЕ на размещение текста выпускной квалификационной работы обучающегося в ЭБС КГПУ им. В.П. Астафьева

Я, ГУСЕВА ЕВГЕНИЯ КОНСТАНТИНОВНА

Разрешаю КГПУ им. В.П. Астафьева безвозмездно воспроизводить и размещать (доводить до всеобщего сведения) в полном объеме и по частям написанную мною в рамках выполнения основной профессиональной образовательной программы выпускную квалификационную работу бакалавра / специалиста / магистра / аспиранта на тему «Мнемотехника как педагогическая технология формирования и развития предметных результатов при обучении биологии» (далее – ВКР) в сети Интернет в ЭБС КГПУ им. В.П. Астафьева, расположенном по адресу <http://elib.kspu.ru>, таким образом, чтобы любое лицо могло получить доступ к ВКР из любого места и в любое время по собственному выбору, в течении всего срока действия исключительного права на ВКР.

Я подтверждаю, что ВКР написана мною лично, в соответствии с правилами академической этики и не нарушает интеллектуальных прав иных лиц.

27.05.2020



Красноярский
государственный
педагогический университет
им. В.П.Астафьева

СПРАВКА о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

**Проверка выполнена в системе
Антиплагиат.ВУЗ**

Автор работы	Гусева Е.К.
Подразделение	
Тип работы	Выпускная квалификационная работа
Название работы	Тема Проект исследовательской работы «Белковый паспорт адипозного органа» в профильных естественнонаучных классах старшей школы
Название файла	Тема Проект исследовательской работы «Белковый паспорт адипозного органа» в профильных естественнонаучных классах старшей школы.pdf
Процент заимствования	10.86 %
Процент самоцитирования	0.00 %
Процент цитирования	0.00 %
Процент оригинальности	89.14 %
Дата проверки	18:44:06 27 мая 2020г.
Модули поиска	Модуль поиска ИПС "Адилет"; Сводная коллекция ЭБС; Коллекция РГБ; Цитирование; Модуль поиска переводных заимствований; Модуль поиска переводных заимствований по eLibrary (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по интернет (EnRu); Модуль поиска переводных заимствований по Wiley (RuEn); Коллекция eLIBRARY.RU; Коллекция ГАРАНТ; Модуль поиска Интернет; Коллекция Медицина; Модуль поиска перефразирований Интернет; Коллекция Патенты; Кольцо вузов; Коллекция Wiley
Работу проверил	Елсукова Елена Ивановна ФИО проверяющего
Дата подписи	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 20px;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 20px;"></div> </div> <p style="text-align: right; margin-top: 5px;">Подпись проверяющего</p>

Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.



Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

ОТЗЫВ НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ

о работе студентки 5 курса факультета биологии, географии и химии Гусевой Е.К. над научно-исследовательской работой «Анализ белковых спектров лизатов жировых тканей белого, бурого и конвертируемого типов у молодых и старых мышей ICR».

Евгения Гусева в течение двух лет работала по теме научно-исследовательской работы. За этот небольшой период времени ей удалось освоить сложный комплекс анатомо-физиологических и биохимических методов. Особо следует отметить успехи студентки в освоении методики высокоразрешающего ступенчатого белкового ПААГ-электрофореза и современного программного обеспечения для денситометрии ПААГ гелей и для определения молекулярных масс белков. Студентка получила также навыки работы с международной базой геномных и протеомных данных UniProtKB/SwissProt, с компьютерной программой Panther.db, предназначенной для классификации белков при протеомных исследованиях. Полученные результаты были представлены на научно-практической конференции студентов и аспирантов «БиоЭко» в 2019 г. и опубликованы в материалах конференции.

Евгения в научном коллективе успешно курировала научно-исследовательскую работу школьников.

По совокупности всего вышесказанного считаю, что работа Е. Гусевой над научно-исследовательской работой заслуживает оценки «отлично»

Кандидат биологических наук
доцент кафедры биологии,
химии и экологии КГПУ им.
В.П. Астафьева



Е.И. Елсукова

ВВЕДЕНИЕ

В современной школе большое внимание уделяется исследовательской деятельности обучающихся [5, 9, 14]. Помощь школе в организации этой формы работы со способными школьниками часто оказывают вузовские и академические лаборатории. В нацпроекте «Наука» и нацпроекте «Образование» этот вид сотрудничества РАН, университетов и школы рассматривается как приоритетный для обеспечения притока молодежи в науку [1], подготовки научных кадров, обеспечения конкурентоспособности в передовых научных технологиях [11, 12]. Опыт работы со старшеклассниками накоплен в лаборатории физиологии и биохимии энергообмена ФБГХ КГПУ, материально-техническая база позволяет организовать исследовательскую работу школьников по молекулярной биологии, о недостаточном внимании к которой в школьных учебниках отмечалось на заседании президиума РАН [15].

Основное научное направление лаборатории – выяснение закономерностей адипогенеза у высших животных и человека. Рост интереса научного сообщества к жировым тканям обусловлен их важной ролью в эволюции эндотермии и гомойотермии, в развитии метаболических нарушений в процессе нормального старения [19, 40]. Жировые ткани млекопитающих и человека представлены подкожным и абдоминальным депо, относительно небольшими висцеральными скоплениями белого и бежевого жира, скоплениями бурого жира [6, 20, 37]. В последние годы в связи с открывающейся тесной функциональной взаимосвязью между разными типами жировых клеток и тканей их объединяют в единый жировой или адипозный орган [20]. Для глубокого понимания нормального функционирования адипозного органа и его возрастных изменений необходимы паспортизация

белков жировых тканей разных типов и анализ динамики тканевых протеомов при старении [27, 43].

Знакомство старшеклассников с этой проблемой полезно как для углубления их знаний в молекулярной биологии и физиологии, так и для расширения представлений о современных высокотехнологических методах в биологии

Цель работы: Проектирование исследовательской работы старшеклассников по теме «Белковый паспорт адипозного органа».

Задачи:

1. Подготовить литературный обзор о современном состоянии протеомных исследований жировых тканей разных типов;
2. Освоить методы разделения и анализа белков жировых тканей;
3. Сопоставить содержание общего белка и электрофоретические белковые спектры в бурой, белой и бежевой жировых тканях у 3 и 12-мес лабораторных мышей;
4. Подготовить методические материалы для научно-исследовательской работы старшеклассника.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМАТИКЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ.

1.1 Концепция адипозного органа. Анатомо-морфологические и физиологические особенности представленных в нем жировых тканей.

Концепция адипозного органа была выдвинута итальянским гистологом Саверио Цинти в 2000 г [20]. Во-первых, она стала, по словам самого автора, отражением быстро прогрессирующего роста работ по молекулярной и клеточной биологии, физиологии жировых тканей, пересмотра прежних представлений о белой жировой ткани как метаболически инертном депо, о бурой жировой ткани как о структуре, отсутствующей у взрослого человека и типичной только для младенцев и мелких млекопитающих. Другая причина появления этой концепции – возникшее понимание тесной функциональной взаимосвязи между разными типами жировых тканей, необходимость комплексного анализа изменений со стороны всех разных типов жировых тканей при исследовании реакции организма на те, или иные воздействия. Например, ответ на ограниченную пищевую рестрикцию бурого жира может быть двояким в зависимости от состояния подкожного и абдоминального белого жира [29]. Наконец, анатому в организме человека и животных часто непросто выделить то или иное скопление или депо жировых тканей из-за наличия непрерывных переходов между ними. Например, над межлопаточной бурой жировой тканью находится «подушка» белой жировой ткани, связывающая бурый жир с подкожным депо белого жира. В физиологии эта концепция постепенно приживается, разные типы жировых тканей встраиваются в единую функциональную систему поддержания энергетического баланса.

Три составляющих адипозного органа типичная белая жировая ткань, типичная бурая жировая ткань, легко вступающая в трансдифференцировку

конвертируемая жировая ткань. Особенность последней – наличие двух стационарных состояний (энергодепонирование и термогенез) и легкость перехода зрелых адипоцитов между этими состояниями. В онтогенезе все три типа закладываются в мезодерме сомитов [25, 41]. Предшественники бурых адипоцитов ведут происхождение от $Myf5^+$ клеток дермомиотома, а предшественники типичных белых и способных к конвертации в бежевый тип адипоцитов ведут происхождение от $Myf5^-$ клеток латеральной мезодермы сомитов [41].

В филогенезе, вероятно, раньше появились типичные белые адипоциты [35]. Зрелые белые адипоциты представляют крупные округлые клетки с одной центрально расположенной крупной липидной каплей, отесняющей цитоплазму с ядром на периферию. Липидная капля покрыта монослойной фосфолипидной мембраной, на которой локализованы ферменты липолиза и липогенеза. Считалось, что клетки белой жировой ткани практически не обновляются в постнатальном онтогенезе, но исследования последних лет опровергли эту точку зрения [40]. Скорость обновления выше у молодых животных и значительно тормозится в ходе естественного старения [19]. Высококалорийный рацион питания ускоряет возрастное нарушение процессов клеточного обновления в жировых депо [19].

Энергозапасание в форме триглицеридов или нейтральных жиров – основная функция белого адипоцита. В активное время суток избытки глюкозы и жирных кислот, получаемые с пищей, направляются инсулином в жировую ткань и используются для синтеза нейтральных жиров [13]. В неактивное время суток жиры в жировой ткани, наоборот, расщепляются до глицерина и жирных кислот, жирные кислоты кровью переносятся в разнообразные ткани и органы и используются для окисления и извлечения энергии или для синтеза фосфолипидов, стероидов и восстановления клеточных мембран. Сбалансированное протекание этих сложных ферментативных процессов,

называемых в биохимии липогенезом и липолизом, соответственно, определяет метаболическую активность жировой клетки.

Основные депо белого жира - подкожное и абдоминальное (внутрибрюшное). Подкожная жировая ткань располагается в верхней части спины и, особенно в ягодичной и паховых областях тела. У лабораторных мышей в подкожном депо, как правило, доминирует по размерам паховое скопление [3, 19, 32]. Абдоминальное депо включает несколько скоплений жировой ткани. У грызунов самым крупным являются парные окологонадные скопления, окружающие семенники и их придатки у самцов, рога матки и яичники у самок, в порядке убывания следующими можно назвать парные ретроперитонеальные скопления, на которых располагаются почки; мезентериальный жир располагается в брыжейке. У человека в абдоминальном депо преобладает наджелудочный жир, так называемый сальник.

Жировая ткань – важный эндокринный орган. Адипоциты секретируют многочисленные гормоны [45], среди которых наиболее изучены лептин и адипонектин. Лептин — один из основных гормонов белой жировой ткани [13]. Он играет ключевую роль в регуляции энергетического гомеостаза, сигнализируя головному мозгу о запасах жира в организме, так как адипоциты секретируют лептин в количествах, пропорциональных массе жировой ткани. Предполагают, что именно лептин запускает половое созревание, ставя его в зависимость от достаточности энергосубстратов [13]. Снижая аппетит, лептин переключает поведение животных на решение других не связанных с удовлетворением пищевой потребности репродуктивных задач. Адипонектин поддерживает достаточную чувствительность к инсулину, использование глюкозы преимущественно для энергозапасания, а не для синтеза стероидов.

Типичная бурая жировая ткань, по-видимому наиболее позднее приобретение эволюции, характерна только для плацентарных млекопитающих [30]. Она представлена межлопаточным, шейным, подмышечным,

околопочечным скоплениями [3, 37]. В структуре энергообмена бурый жир выполняет функции рассеяния энергии химических связей в тепловую энергию. Этот процесс известен как несократительный термогенез. Бурый жир располагается в наиболее открытых с высоким уровнем теплопотерь участках тела, вдоль крупных кровеносных сосудов, направляющих кровь в жизненно важные органы. Самым крупным скоплением у мелких грызунов является межлопаточный бурый жир, подогревающий поверхности спины и вену Сульцера, несущую кровь от кожи и поверхностных мышц спины на переднюю сторону в нижнюю полую вену [20]. Не менее важны шейный бурый жир, подогревающий позвоночные артерии, подмышечный бурый жир, подогревающий вены, возвращающие кровь от верхних конечностей в сердце. Околопочечное скопление расположено в области ворот почек, через которые магистральные сосуды снабжают кровью почки, у мелких животных описаны скопления бурых адипоцитов в районе перикарда [4].

Буроватый цвет скоплений бурого жира обусловлен высоким содержанием богатых цитохромами митохондрий [6, 16, 19, 21], частично также плотной васкуляризацией бурой жировой ткани. Васкуляризация бурого жира увеличивает транспортную емкость питательных веществ и обеспечивает своевременный перенос тепла. Плотность митохондрий обеспечивает высокую окислительную и термогенную способность. Многочисленные крупные митохондрии сосредоточены вокруг небольших липидных капель. Митохондрии имеют систему сильно развитых крист, сжатых в поперечном направлении, что значительно увеличивает площадь внутренней мембраны, где располагается переносчики электронов ЭТЦ. Рассеяние энергии протонного градиента в тепло осуществляет особый содержащийся только в термогенных жировых тканях белок термогенин или в соответствии с научной номенклатурой разобщающий белок 1 (uncoupling protein – UCP1) [6, 16, 30]. Это название отражает факт, что термогенин разобщает окисление от синтеза АТФ.

Разобщение достигается транспортом H^+ в составе длинноцепочечной жирной кислоты через канал белка UCP1 в матрикс митохондрий [44].

Основные окисляемые субстраты в буром адипоците — жирные кислоты. В отличие от крупных однослойных жировых вакуолей белых адипоцитов, бурые адипоциты содержат многоклеточные жировые капельки, которые позволяют быстро мобилизовать триглицериды. Экспериментальные измерения скорости энергообмена в буром жире, а также его анатомическая локализация вблизи жизненно важных органов или вдоль кровеносных сосудов, снабжающих кровью или отводящих кровь к сердцу, как раз и послужили основой для предположения о термогенной функции (образование локального тепла) [30]. Как и в белых адипоцитах так, и в бурых постоянно идут процессы липолиза и липогенеза, но для собственных внутренних нужд. Термогенез значительно ускоряет метаболизм бурого адипоцита. Именно с высокой метаболической активностью этих клеток связаны и отличия их внешнего вида с белыми жировыми клетками. Бурые адипоциты мельче белых, имеют полигональную форму, что увеличивает их клеточную поверхность и увеличивает транспорт необходимых для термогенеза метаболитов.

Относительная масса бурого жира у животных одного вида, как правило, тем выше, чем моложе животное и меньше его размеры, т.е. чем больше у него теплопотери на единицу массы тела. Это еще раз указывает на терморегуляторную роль бурого жира [6]. У мелких млекопитающих бурая жировая ткань сохраняется всю жизнь. У крупных животных- хищных и копытных - бурый жир представлен в основном в первые дни рождения, а в последующем замещается типичной белой жировой тканью [46]. У человека активный бурый жир обнаруживается на протяжении всей жизни в глубоких слоях надключичной и заднешейной жировой ткани [36]. Относительная масса скоплений бурого жира значительно больше у животных, впадающих в гибернацию.

Третий тип жировой ткани описан недавно. Она представлена буроподобными UCP1-экспрессирующими адипоцитами в депо белой жировой ткани. В связи с тем, что эти клетки относятся к другой клеточной линии, отличной от бурых адипоцитов, они получили другое название - бежевые адипоциты [6]. Кроме того это название отражает их промежуточный морфотип по содержанию митохондрий, по количеству липидных капель между белыми и бурыми адипоцитами. Содержание бежевых адипоцитов выше в подкожном жировом депо, по сравнению с абдоминальным жировым депо. Природа бежевых адипоцитов интенсивно изучается. В подкожном депо их количество может многократно возрастать при холодовой адаптации за счет обратимой трансдифференцировки зрелых адипоцитов с белым фенотипом. Этот процесс в англоязычной литературе называют *browning* (побурение при дословном переводе на русский язык). При *браунинге* по содержанию митохондрий, цитохромов и UCP1 в них бежевые адипоциты практически не отличаются от бурых. Мощность теплообразования самым крупным паховым скоплением подкожного депо у животных, адаптированных к холоду, составляет 10-30% от теплообразования в самом крупном межлопаточном скоплении бурого жира [2]. При адаптации к термонеutralной среде бежевые адипоциты снова возвращаются к белому фенотипу. Подобно подкожному депо бежевые адипоциты обнаруживаются, но в значительно меньшем количестве в абдоминальном депо, преимущественно в ретроперитонеальном скоплении, вдоль брюшной аорты, в красном костном мозге, в тимусе, в молочной железе. В этих структурах природа бежевых адипоцитов не ясна, их тепловой выход незначителен. Процессы трансдифференцировки не обнаружены.

1.2. Возрастные изменения жировых тканей

Старение сопровождается выраженными изменениями жировых депо, которые можно разбить на 2 стадии. На ранних этапах старения имеет место значительный рост их массы. Возрастает доля крупных адипоцитов с единственной, занимающей почти весь объем клетки липидной каплей и низким содержанием цитоплазмы, пропорционально увеличивается содержание макрофагов. Установлено, что макрофаги направляются в жировые ткани для фагоцитоза клеточного дебриса, который образуется из-за усиленной гибели крупных адипоцитов. Фагоцитоз сопровождается продукцией в макрофагах токсичных и для жировых клеток и для клеток окружающих тканей свободных радикалов кислорода. Высокий пролиферативный и дифференцировочный потенциал преадипоцитов (т.е. их способность к делению, скорость деления и созревания) обеспечивает не только восстановление клеточности, но и рост жировых тканей [14]. Однако постепенно преадипоциты утрачивают эту способность, на поздних стадиях старения масса жировых тканей может снижаться, при этом жиры накапливаются в других типах клеток, например, в клетках сосудистой стенки, в гепатоцитах и др, ухудшая функционирование жизненно важных органов. Темпы развития атеросклеротического повреждения сосудов, жировой дистрофии печени, саркопении тесно связаны с вышеописанными изменениями абдоминального жирового депо [19,22] .

В подкожном жировом депо не только уменьшается общее количество клеток, но и уменьшается доля термогенных бежевых адипоцитов, а также способность белых адипоцитов под влиянием низких температур трансформироваться в термогенный бежевый тип. У мышей линии СВАС57В16 бежевые адипоциты не обнаруживаются в паховом жире в возрасте 12 мес. В буром жире старых животных уменьшено содержание. Сведения о содержании бурого жира неоднозначны. Слабо изучен первый этап старения, имеющиеся в

литературе данные относятся к «финальному» возрасту (24-27 мес). Масса межлопаточного скопления не меняется у 24-мес крыс Fisher по сравнению с молодым контролем. В обоих случаях в межлопаточной БЖТ уменьшена холод-индуцированная клеточная пролиферация, уменьшены содержание митохондрий, интенсивность холод-индуцированного термогенеза.

1.3 Современные методы протеомного анализа

В современных исследованиях механизмов адаптивных, возрастных, патологических изменений на первое место выходят транскриптомный и протеомный анализы. Поскольку все виды работ в клетке выполняются белками, все тонкости функционирования клетки, ткани, органа может быть описано через состав экспрессируемых белков (протеом) и их относительное количество. Хотя в целом состав иРНК (транскриптом) отражает состав синтезируемых белков, имеются и исключения из этого правила, поэтому более валидным для представления о белковой экспрессии является протеомика [23]. Ее быстрому развитию в последние годы способствовало создание таких высокоразрешающих методов как двумерный электрофорез, высокоразрешающая жидкостная хроматография, совмещенная с масс-спектрометрией, вестерн-блоттинг.

Электрофорез – метод разделения белков по их подвижности в геле, находящемся в электрическом поле. Подвижность зависит от суммарного электрического заряда белковой молекулы, от размера и формы молекулы, от характеристик внешнего электрического поля [7]. Для характеристики белков по их молекулярным массам или для идентификации белков с известной молекулярной массой используется электрофорез в денатурирующих условиях с такими денатурирующими агентами как сильный ионный детергент додецилсульфат Na (ДСН) и меркаптоэтанол. Существенно повысить разрешающую способность метода удалось Леммли [Laemmli, 1970 – цит. по 9],

разработавшем методику ступенчатого или диск-электрофореза. Сущность метода заключается в предварительном концентрировании белкового раствора с помощью специального высокопористого геля над основным разделяющим гелем. Концентрирование достигается за счет торможения белков на границе с разделяющим гелем и за счет разных буферных систем двух гелей [24]. Применение ступенчатого электрофореза позволило разделять до двух десятков белковых полос. Важным шагом к дальнейшему совершенствованию разделяющей способности стал двумерный электрофорез, в котором ступенчатому электрофорезу предшествует разделение нативных белков по различиям их изоэлектрических точек. Такая модификация позволила довести глубину протеомного анализа до нескольких сотен белков.

Наибольшей разрешающей способности при протеомном анализе (до нескольких тыс белков в образце) удалось достичь с помощью ВЭЖХ/МС.

После разделения белковой смеси еще одним этапом является идентификация, функциональная классификация белков, особенно при сравнительном анализе белков с измененной экспрессией [37]. Во-первых, изменения часто затрагивают сотни белков, во-вторых, сведения о многих открытых параллельно с расшифровкой генома белках крайне малочисленны. Наиболее полная информация о белках и их генах, предоставляемая в свободное пользование, собрана в базе данных UniProt, курируемой несколькими крупными институтами биоинформатики в Европе и США. Функциональные характеристики белков, их субклеточная локализация, белок-белковые взаимодействия представлены в разделе UniProtKB/SwissProt. Чтобы облегчить работу по классификации сотен белков с измененной экспрессией в последнее время разрабатываются специальные компьютерные программы. Одна из них Panther (Protein analyses through evolutionary relationships) в сети интернет находится в свободном доступе. Panther классифицирует белки в

анализируемом протеоме по молекулярной функции, биологическим процессам, клеточной локализации, метаболическим и сигнальным путям [38]

1.4 Протеом адипозного органа

Начиная с 2010 г. развиваются протеомные исследования жировых тканей. Одно из важных направлений – сравнительный анализ клеточного протеома в ходе адипогенеза по белому или бурому пути дифференцировки. Эти задачи решаются с использованием линии мышечных 3T3-L1 адипоцитов или на культуре стволовых клеток, жировой ткани человека. Уже полученные результаты привлекают внимание к группе гликоген-синтезирующих белков, некоторым белкам теплового шока, белкам цитоскелета, секреторным белкам – как потенциальным маркерам некоторых стадий дифференцировки белого адипоцита. Основное внимание при изучении термогенных адипоцитов обычно уделялось элементам термогенного аппарата, регуляции их экспрессии. Неожиданные результаты получены для адипоцитов, культивируемых из стволовых клеток надключичной БЖТ человека и проявляющих свойства бурого и бежевого фенотипов [Müller et al, 2016]. Наряду с традиционными термогенными маркерами в них выявлена повышенная экспрессия креатинкиназ, их участие в формировании сложного надмолекулярного комплекса, эффективно сопрягающего потоки метаболитов. По мнению авторов, эти данные указывают на назревшую необходимость переоценки сопряженного дыхания в термогенных клетках, его важной роли для интенсивных биосинтетических и пролиферативных процессов, по крайней мере, в БЖТ. Второе направление – сравнительный анализ протеомов клеточных органелл БелЖТ и БЖТ. Митохондриальный протеом БЖТ оказался близок к протеому митохондрий скелетных мышц [Fornier et al., 2009], подтверждая общность их происхождения от клеток дермомиотома. Набор белков в митохондриях БЖТ отражает преимущественное использование

липидов в качестве субстратов окисления. В БЖТ обнаружена киназа, инактивирующая пируватдегидрогеназный комплекс, снижая использование углеводов для термогенеза. Набор белков в митохондриях БелЖТ перенаправляет цитрат и АТФ на цели липогенеза.

Третье направление – характеристика протеомов интактной БелЖТ или БЖТ, которые, как известно, кроме адипоцитов содержат межклеточный матрикс, некоторые другие типы клеток, в частности макрофаги, эозинофилы. Двумерный электрофорез с ВЭЖХ/МС использовался для поиска маркеров нормального старения ретроперитонеальной жировой ткани абдоминального депо. Среди выявленных белков с измененной экспрессией есть белки цитоскелета, белки внеклеточного матрикса, включая несколько семейств протеаз. Таким образом протеомный профиль подтверждает, по мнению авторов, развитие хронического воспалительного процесса в типичной белой жировой ткани [42].

Таким образом, современный этап протеомных исследований жировых тканей можно охарактеризовать как этап быстрого накопления новых сведений о разных сторонах биологии адипоцитов. В тоже время ощущается недостаток данных для сравнительного анализа протеомов разных жировых тканей у человека, у животных одного вида или линии. Как правило, исследование выполняется одному, в лучшем случае по двум депо либо по образцам бурой жировой ткани. Это дает надежду на выход из тупика в понимании патофизиологии ожирения и связанных метаболических расстройств.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

Исследования проведены на самках мышей линии ICR, содержащихся при стандартных условиях вивария: 23 С, свободный доступ к воде и корму. Возрастные группы формировались в соответствии с возрастной периодизацией жизни мышей, разработанной Джексоновской лабораторией [1]. Возраст около 3-3,5 мес. соответствует прекращению роста тела в длину, возраст 12 мес. – пожилые мыши (примерно соответствуют возрасту 50 лет у человека). При выполнении манипуляций с животными придерживались правил Женевской декларации о гуманном отношении к лабораторным животным.

2.2. Выделение 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.

2.3. Определение тканевого белка по методу Лоури

1) 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-НСl буфера с 1 мМ ЭДТА, рН 7,2. 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.

Несолубилизированные кусочки ткани в ходе центрифугирования осаждались на дно пробирки. Отбирали 0,338 мл надосадочной жидкости, добавляли к ней 0,162 мл H_2O . 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 [18]. При определении содержания белка в пробе, приготовленной для электрофореза, значения, полученные по калибровочной прямой для умножали в 100 раз. Тканевой белок рассчитывали в мкг/мг ткани.

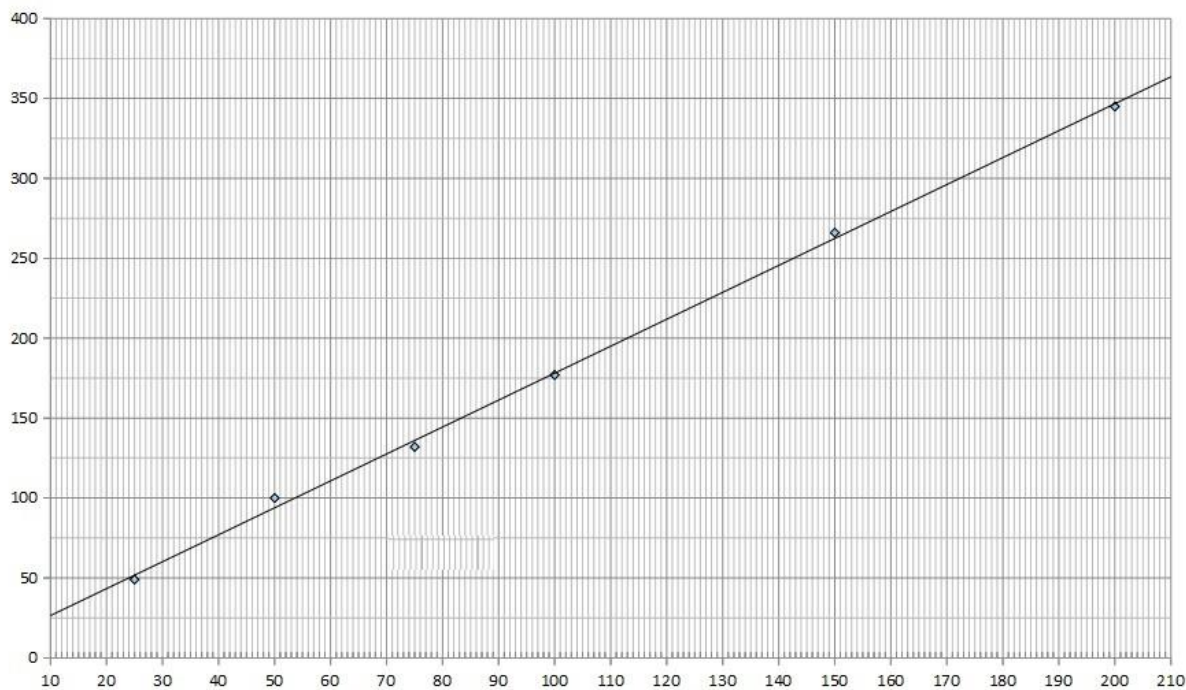


Рисунок 1. Калибровочная прямая, полученная в работе для определения концентрации белка в тканевых гомогенатах.

2.4. Разделение клеточных белков с помощью ПААГ электрофореза

2.4.1. Реактивы и оборудование

Для приготовления гелей использовали 30% акриламид и 1% бисакриламид: 1 М ТрисНСl, рН 8,8 и 1 М ТрисНСl, рН 6,8, 10% раствор ДСН, 10% раствор персульфата аммония и ТЕМЕД. Требуемые соотношения указаны в таблице 1.

Таблица 1.

Состав гелей.

Компоненты	Разделяющий 12,5% гель	Концентрирующий 5% гель
30% акриламид	4,16	1,67
1 М Трис рН 8,8	3,75	-
1М Трис рН 6,8	-	1,26
H ₂ O	1,9	6,95
10% додецилсульфат Na	0,1	0,1
10% персульфат аммония	0,1	0,1
ТЕМЕД	0,008	0,01

Для заполнения резервуара с гелями и электродами использовался электродный 25 мМ Трис-глициновый буфер рН 8,3 с 0,1% ДСН. В качестве буфера нанесения использовали 62,5 мМ ТрисНСl с 2% ДСН, 10% глицерина, 5% меркаптоэтанола. Электрофорез проводили в установке Mini-PROTEAN-tetra cell (Bio-Rad, Sweden).

2.4.2. Этапы ПААГ электрофореза

1. Приготовление пробы. Для более полного освобождения пробы от липидов сначала добавляли к ней буфер с ДСН и через 15 мин центрифугировали пробу при 9000g в рефрижераторной центрифуге. После центрифугирования отбрасывали флотирующие липиды и только затем добавляли меркаптоэтанол, глицерин и бромфеноловый синий до концентраций, указанных выше. Пробы плотно закрывали пробками и кипятили в течение 5 мин.

2. Приготовление гелей и электрофорез формы для заливки гелей формировали с помощью специальной заливочной рамки, входящей в комплект установки для электрофореза. Последовательно заливали сначала разделяющий 12,5 % гель. После его полимеризации заливали концентрирующий 5% гель и вставляли «расческу» для формирования в геле кармашков для внесения препаратов. Окончательно стекла с гелями вставляли в специальную ячейку, которую помещали в резервуар в электродным буфером. Под слой буфера аккуратно вносили микропипеткой пробы. Объем проб подбирали так, чтобы нагрузка тканевым белком составляла примерно 8 мкг. На каждом геле выделяли трек для маркеров молекулярных масс. Напряжение на 2 геля составляло сначала 10В, после вхождения проб на 10 см в гель 20В. Электрофорез считали законченным, когда полоса бромфенолового синего доходила до конца стеклянной пластины.

3. Окрашивание гелей. Гели окрашивали 0,25% раствором кумасси G250 в 3,5% хлорной кислоты. Окрашивание ускоряется до 2–3 мин, если гель с красителем нагреть в микроволновке на небольшой мощности. После процедуры окраски гели неоднократно промывались в 7%-м растворе уксусной кислоты.

2.5. Компьютерный анализ ПААГ гелей в программе GelAnalyser.

Gel-Pro Analyzer - программное обеспечение для молекулярной биологии: получение полноценной, качественной и количественной информации от анализа электрофоретических гелей, блот-анализа и оценки колоний.

Программа **Gel-Pro Analyzer** минимизирует временные затраты и автоматизирует процесс вычислений при молекулярном анализе за счет автоматического определения объектов (линий, бэндов) и оценке уровня фона. Программа позволяет определить молекулярные массы, по интенсивности определить примерное содержание белка.

Для работы требуются фотографии формата-jpg гелей загруженных в программу, далее выделяется трек с маркерами и вводятся известные молекулярные массы. Затем при выделении треков с жировыми тканями молекулярная масса определяется автоматически (Рисунок 2).

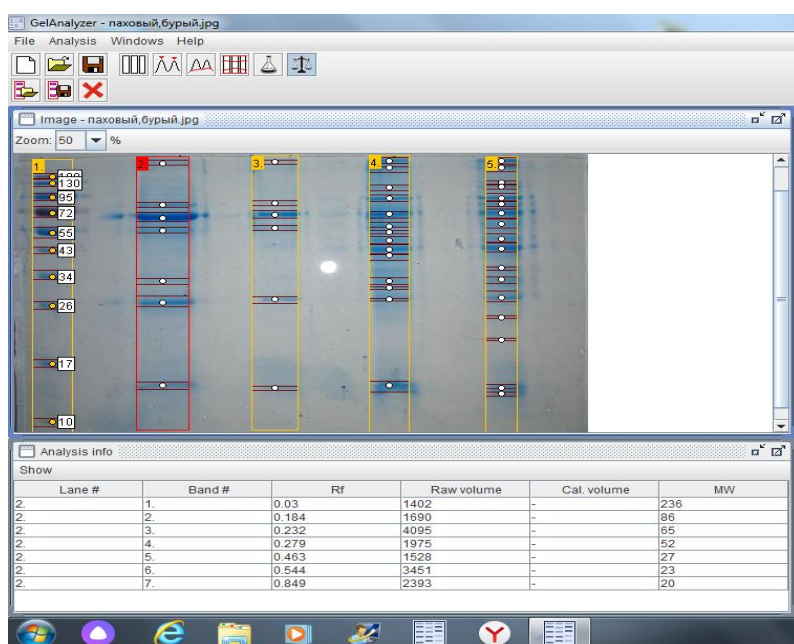


Рисунок 2. Фотография геля ПААГ-электрофорез, трек 1 маркеры с известными молекулярными массами и пробы жировых тканей

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Масса жировых тканей и содержание в них общего белка при старении лабораторных мышей

Масса тела 3-мес мышей составила $31,47 \pm 1,15$ г. У старых животных показатель массы тела был в 2 раза выше по сравнению с молодыми и составил $68,37 \pm 12,14$ ($p < 0,05$). Соответственно индекс массы тела при старении увеличился от $0,315 \pm 0,012$ до $0,665 \pm 0,133$ ($p < 0,05$).

Абсолютная масса всех изученных жировых тканей у старых мышей была выше по сравнению с молодыми (таблица 2). Относительная масса межлопаточного бурого и пахового жира изменялась незначительно, наибольший десятикратный прирост отмечен для внутрибрюшного гонадного жира.

Относительное содержание тканевого белка (мкг/мг) и у молодых и у старых мышей в бурой жировой ткани было выше, чем в окологонадной и паховой белой жировой ткани. Этот факт согласуется с многочисленными данными литературы [12,43,33], по крайней мере, для взрослых репродуктивно компетентных животных и объясняется высоким содержанием митохондрий в этой термогенной ткани и меньшим чем в белой и бежевой жировых тканях содержанием липидов в клетках [12]. При старении этот показатель снижался. В буром жире наблюдалось его двукратное снижение, причем из-за значительной индивидуальной вариабельности оно не было статистически значимым. В окологонадном жире относительное содержание белка снижалось в 4 раза, ($p < 0,05$) а в паховом в 5 раз ($p < 0,05$). Снижение относительного содержания тканевого белка одновременно с значительным увеличением массы жировых тканей позволяет предположить увеличение в тканях гипертрофированных из-за повышенного жиросотложения адипоцитов. Расчеты

показали, что полная белковая фракция пахового депо у старых мышей уменьшается в 1,7 раза, т.е. рост массы ткани происходит за счет увеличенного жиросотложения в адипоцитах. Полный тканевой белок в бурой жировой ткани незначительно на 40% увеличивался, в окологонадной жировой ткани наблюдалось его 4-кратное увеличение. Известно, что в абдоминальном депо, к которому относится окологонадная жировая ткань, у животных и людей с метаболическим синдромом[14].

Таблица 2.

Абсолютная и относительная масса жировых тканей и содержание в них белка при старении лабораторных мышей

	Возраст, мес	3-4	12
Межлопаточная	масса, мг	134,38±30,78	397,50±156,70*
	масса, %	0,42±0,10	0,62±0,24
	белок, мкг/г	122,08±16,06 (4)	58,67±41,23
	Белок, мкг		
Паховая	масса, мг	476,67±45,53	1346,25±415,70*
	масса, %	1,49±0,13	2,13±0,65
	Белок, мкг/мг	41,31±6,49	8,43±3,12*
	Белок, мкг		
Гонадная	масса, мг	468,00±87,74	7879,75±3041,51*
	масса, %	1,45±0,27	12,02±3,12*
	Белок, мкг/мг	32,63±14,28 (6)	8,55±2,16*
	Белок, мкг		

Примечание: В скобках указано количество животных или образцов ткани. Статистическая значимость различий между разновозрастными группами животных - * $p < 0,05$.

Наряду с гипертрофией адипоцитов, аккумуляцией макрофагов, запускающих их апоптоз, имеет место клеточная пролиферация и дифференцировка преадипоцитов [33].

Таким образом, динамика белковой фракции в окологонадной жировой ткани при старении может быть объяснена с учетом этой компенсаторной пролиферативной реакции. Имеются предположения о неполной измененной дифференцировке адипоцитов у старых животных [44]. Анализ тканевого протеома позволяет выявить эти изменения.

3.2. Состав белков в бурой и белой жировых тканях мышей разного возраста.

В пробах бурого жира 3-месячных мышей выявлено 17 белковых полос с молекулярными массами в диапазоне 20-252кДа. Наибольшую интенсивность, которая пропорциональна количеству белка, имели полосы, содержащие белки с молекулярными массам 252,210,101,73кДа.

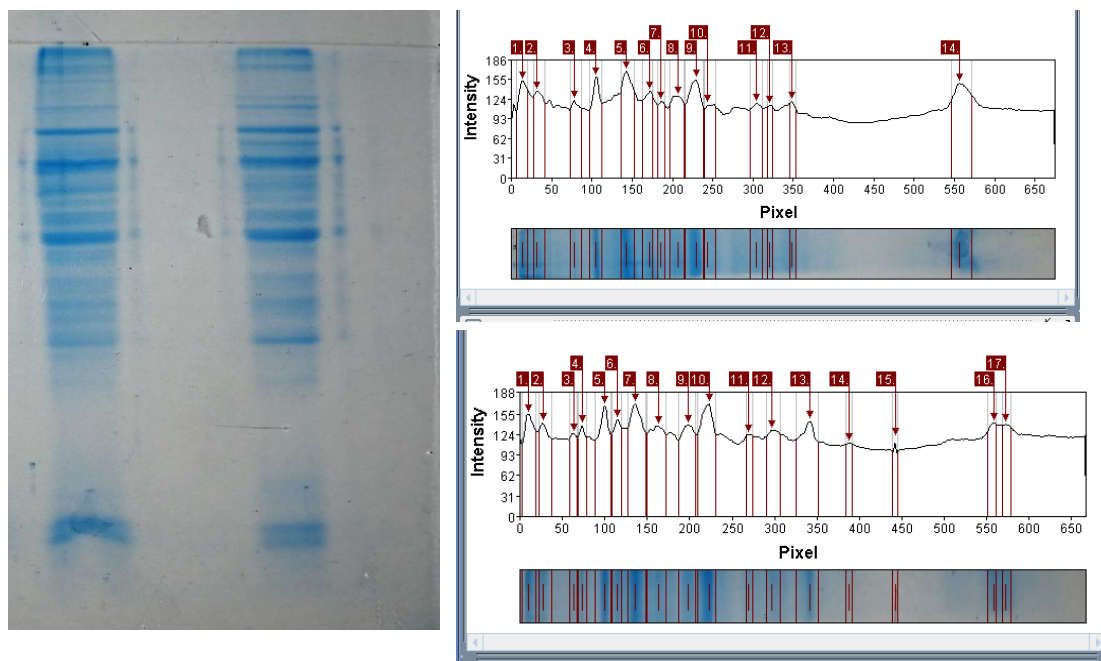


Рисунок 3. Электрофореграмма и денситограммы межлопаточной бурой жировой ткани молодых и старых мышей.

*На этом и следующих рисунках пробы старых мышей – левый трек на электрофореграмме, верхняя денситограмма; пробы молодых мышей – правый трек и нижняя денситограмма.

У старых мышей выявлялось только 14 белковых полос. Доминирующие белки сохранялись, не наблюдалось и существенных изменений их интенсивности на денситограмме. Ряд минорных (низкоинтенсивных) белковых полос с молекулярными массами 144, 88, 22, 20 кДа у старых животных отсутствовал.

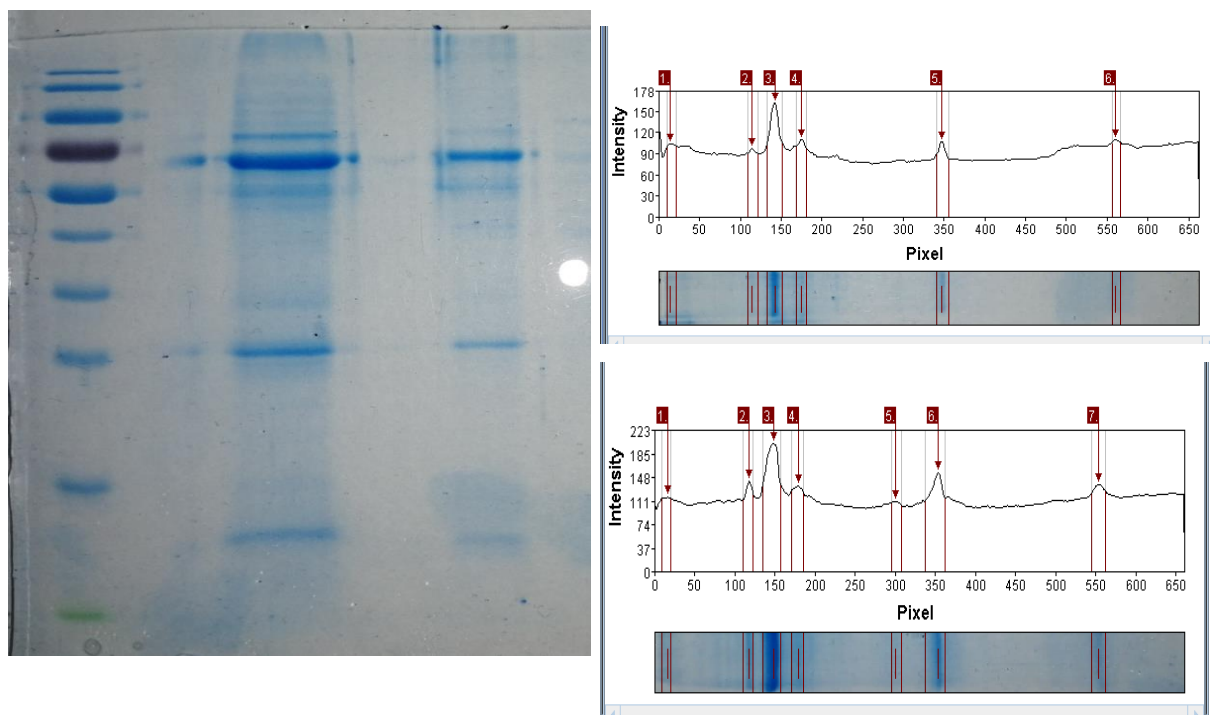


Рисунок 4. Электрофореграмма и денситограммы проб паховой жировой ткани молодых и старых мышей

В пробах пахового жира старых мышей выявлено 7 белковых полос в диапазоне молекулярных масс 20-236кДа. Наибольшую интенсивность имели

полосы с молекулярными массами 65,23,20кДа. В пробах молодых животных отсутствовала минорная полоса с массой 27 кДа.

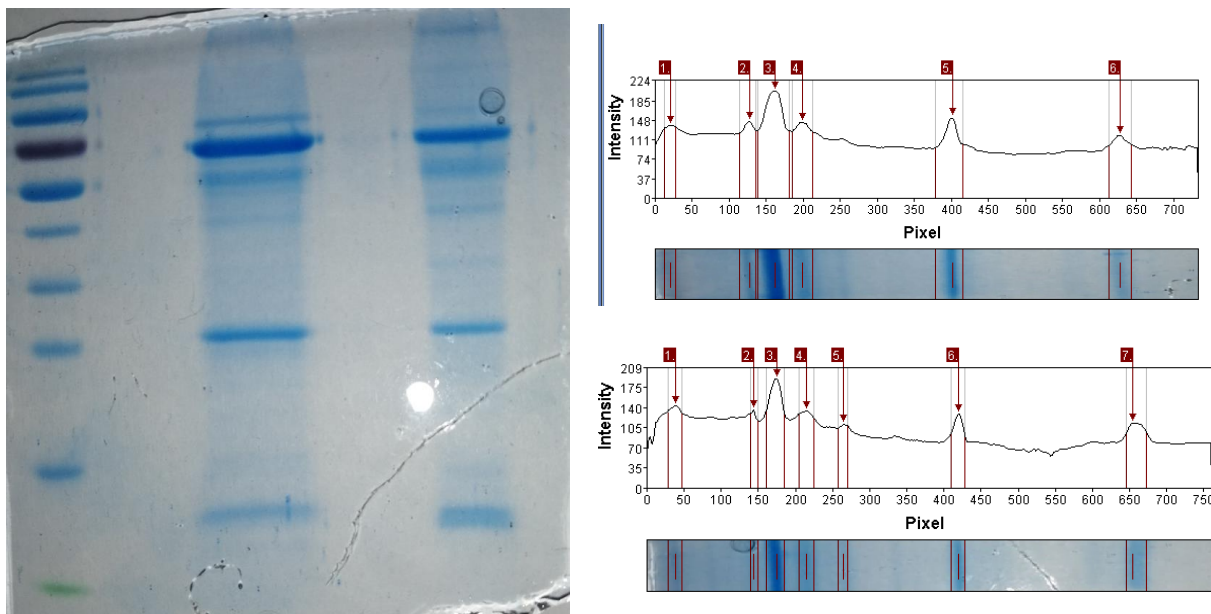


Рисунок 5. Электрофореграмма и денситограммы проб гонадной жировой ткани молодых и старых мышей.

В пробах гонадного жира 3-месячных мышей выявлено 7 белковых полос с молекулярными массами в диапазоне 20-154кДа. У 12-месячных мышей выявлено только 6 полос, отсутствует полоса с молекулярной массой 125 кДа. Обращает внимание большое сходство электрофореграмм паховой и гонадной жировых тканей, в то время как состав белков на электрофореграмме бурого жира существенно другой. Эти различия электрофоретического спектра согласуются с онтогенетическим происхождением бурой и белой жировых тканей от разных линии стволовых клеток. Хотя на поздних стадиях онтогенеза расходятся линии клеток предшественников адипоцитов подкожного и абдоминального депо 1D электрофорез не показывает эти особенности развития разных жировых депо.

Таким образом, в жировых тканях старых животных наряду с общим угнетением белкового обмена происходят изменения в составе клеточных белков. Одномерный электрофорез – первый этап описания тканевого протеома. Выявление даже на этом этапе возрастных изменений протеома в жировых тканях всех трех типов указывает на глубокие перестройки метаболизма в них. Для более глубокого понимания существа этих перестроек планируется выполнение высокоразрешающего двумерного электрофореза, включающего в качестве второго этапа изоэлектрическое фокусирование. Кроме того, представляет особый интерес экспрессия общего термогенного белкового маркера бурых и бежевых адипоцитов – разобщающего белка UCP1. Для его идентификации будет использован вестерн-блоттинг термогенного маркера белка UCP1.

ГЛАВА 4. ЭТАПЫ ВЫПОЛНЕНИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЕГО 10КЛАССА.

Современные методы белковой химии, анализ клеточных и тканевых протеомов привлекают внимание старшеклассников, обучающихся в профильных биолого-химических и медицинских классов. Поскольку прием в эти классы проходит на конкурсной основе, занятия проводятся не только школьными учителями, но и вузовскими преподавателями обучающихся в них старшеклассников отличает высокий уровень биологических знаний, осознанный интерес к современным научным исследованиям по молекулярно-клеточной биологии, биотехнологии и фундаментальной медицине. Научно-исследовательская работа является обязательным элементом учебного процесса [11]. В ходе интернатуры для заинтересованных учащихся медицинского 10Е класса школы №153 Образовательного комплекса «Покровский» была проведена экскурсия в лабораторию биохимии и физиологии энергообмена при кафедре биологии, химии и экологии КГПУ им. В.П. Астафьева, после которой четверо десятиклассниц прошли небольшой лабораторный практикум. Одна из школьниц приняла предложение выполнить научно-исследовательскую работу в рамках проекта «Белковый паспорт адипозного органа».

Методическое сопровождение работы школьницы включало индивидуальный план НИР, пояснительную записку с обоснованием актуальности исследования, выдвижением гипотезы, постановкой цели и задач, примерный список литературы, иллюстрированное руководство к выполнению белкового ПААГ электрофореза. Составленный совместно с школьницей индивидуальный план кроме подробно расписанных этапов работы включил примерные сроки их выполнения и конкретные результаты (таблица 3) и по сути представлял календарное планирование работы.

Таблица 3.

Индивидуальный план научно-исследовательской работы

Франц Ксении, обучающейся 10 «Е» класса МАОУ «Средняя школы №153»

Этапы работы	Сроки	Конкретный продукт
1. Обсуждение темы исследовательской работы, научной проблемы, решаемой в ходе его выполнения, рекомендации по работе с основной литературой и самостоятельному поиску дополнительной литературы	14.01.2020	Заинтересованный обучающийся, знающий и понимающий суть работы.
2. Знакомство с работой в лаборатории, составление индивидуального плана, знакомство с методологией исследования.	21.01.2020-	Понимание практического этапа исследовательской работы, знания правил безопасности при работе в лаборатории, знание правил и особенностей написания исследовательской работы.
3. Обзор литературы, написание данной главы.	26.01.2020	Полное понимание теории исследовательской работы. Готовность к

		практической работе. Написанная глава «Обзор литературы».
4.Проведение эксперимента по определению белков по методу Лоури. Практический этап- электрофорез	27.01.2020	Знание метода определения белка по Лоури и практическое его использование, умение работать с лабораторным оборудованием.
5.Получение и проведение сравнительного анализа белковых спектров бурой и белой жировых тканей	03.02.2020	Знание программы Gel Analyzer
6. Обсуждение и корректировка реферата, подготовка текста доклада и презентации. Рекомендации к выступлению.	05.02-26.02.2020	Готовая презентация, текст доклада и исследовательский реферат.
7. Выступление на первом школьном этапе. Конференция проводимая на базе МАОУ «Средняя школа	28.02.2020	Приобретенный опыт публичного выступления с научным сообщением

№153».		
8.Корректировка работы с учетом рекомендаций жюри, подготовка к следующему этапу.	28.02-02.03.2020	Редактированный вариант презентации, доклада и реферата с учетом рекомендаций жюри.
9. Выступление на втором школьном этапе конференции.	03.03.2020	Выступление на втором школьном этапе.

Следует отметить равнодушное отношение, инициативность школьницы, поэтому все предлагаемые материалы прошли совместное обсуждение. Первоначально более широкая формулировка цели работы была конкретизирована с учетом интересов школьницы. Акцент был сделан не просто на описании протеома, а на изучении его изменений в жировых тканях при старении. В *пояснительной записке* дана краткая классификация жировых тканей, описана их функциональная взаимосвязь в рамках адипозного органа. Актуальность работы была обоснована 1) доминированием в старении современного человека именно метаболических нарушений, обусловленных противоречием между «неестественными» условиями среды и высоким ростовым потенциалом жировых тканей; 2) важной ролью белков, выполняющих все виды работ в любой, в том числе в жировой клетке. Исходя из этих посылов выдвигалась *гипотеза* о том, что причиной патологического функционирования жировых тканей в старом организме является измененный качественный и количественный состав белков адипоцитов. Соответственно **целью научно-исследовательской работы ставился анализ содержания и состава белков жировых тканей у молодых и старых лабораторных мышей.**

Конкретизировались *Задачи*:

1. Сопоставить показатели абсолютной и относительной массы жировых тканей белого, бежевого и бурого типов у 3 и 12-месячных мышей
2. Определить и сопоставить содержание общего белка в разных типах жировых тканей у 3 и 12-месячных мышей

Учащейся был предоставлен список базовых литературных источников по теме исследования. В ходе работы она добавила еще ряд источников, преимущественно научно-популярного характера и с известных научно-популярных сайтов, таких как Биомолекула.ru, elementy.ru. Информация о подготовке списка литературы размещена в таблице 4.

Таблица 4.

Список литературы к научно-исследовательской работе школьницы.

Источники, рекомендованные школьнице	Источники, найденные школьницей
<p>1.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.</p> <p>2.Елсукова Е.И. Руководство к лабораторно-практическим занятиям по физиологии человека и животных: учебное пособие / Краснояр. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева. – Красноярск, 2015. – 252 с.</p> <p>3.Замяткина М.А. Бурая жировая ткань в лабораторных моделях замедленного старения // Труды Томского</p>	<p>1.Аутбредные мыши // http://www.spf-animals.ru/animals/mice/outbred/</p> <p>2.Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х., Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома// Ожирение и метаболизм.2004. № 1 . С. 34-45.</p> <p>3.Бурый жир. Бурая жировая ткань / Публикации для учащихся. 18.07.2013. Режим доступа URL: http://exams.ru/fizika/8621/index.html?page=60 (дата обращения: 16.01.2020).</p> <p>4. Протеомика. Режим доступа URL: https://biomolecula.ru/articles/12-</p>

<p>университета – 2010. – Т. 275. - С.199-201.</p> <p>4.Иванов К.П. Основы энергетики организма: Теоретические и практические аспекты. Том 3. Современные проблемы, загадки и парадоксы регуляции энергетического баланса. СПб Наука 2001г. 278 с.</p> <p>5.Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань. Молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза. Красноярск: Изд-во Амальгама. 2002.528с.</p>	<p>metodov-v-kartinkakh-proteomika</p>
--	--

При организации работы большую сложность вызвали 1) недостаток времени у школьников для проведения всего экспериментального цикла; 2) кропотливый, многоэтапный, требующий высокой концентрации внимания характер работы. Дополнительные трудности были связаны с накопившимся у школьниц после учебного дня утомлением. Для облегчения работы школьников, уменьшения возможных ошибок разработано и апробировано иллюстрированное руководство «Белковый ПААГ электрофорез» (Приложение 1). В связи с многоэтапностью метода, использованием большого количества разных растворов, разных видов лабораторной посуды, пипеток, разного оборудования иллюстрированное предоставление информации о последовательности операций имеет несомненные преимущества, уменьшает нагрузку на память и внимание.

Школьница успешно справилась с поставленными задачами. Доклад по итогам работы был представлен на школьной конференции, был рекомендован жюри и представлен также на районной конференции. Важно, что сама школьница, как следует из беседы с ней, осознает значимость участия в научной работе лаборатории с точки зрения приобретения новых знаний, новых умений и навыков экспериментальной работы, своего личностного роста.

Кроме того, выпускная квалификационная работа была апробирована в 2019 году на научной конференции «БИОЭКО»:

1.Елсукова Е.И., Гусева Е.К. Приемы функциональной классификации белков при протеомном анализе/ Елсукова Е.И., Гусева Е.К.//Современные биоэкологические исследования Средней Сибири [Электронный ресурс]: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО». – Электрон. дан. – Красноярск: Красн. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева, 2019,-116с.

2.Якушина М.И., Гаджиева А.К., Гусева Е.К. Пищевые предпочтения лабораторных мышей линии ICR на диете кафетерия/ Якушина М.И., Гаджиева А.К., Гусева Е.К. // Современные биоэкологические исследования Средней Сибири [Электронный ресурс]: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО». – Электрон. дан. – Красноярск: Красн. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева, 2019,-116с.

3.Елсукова Е.И., Трегузов А.А., Гусева Е.К. Метаболическая активность жировых тканей бурого и белого типов у аутбредных мышей ICR (предварительное исследование)/ Елсукова Е.И., Трегузов А.А., Гусева Е.К. //Современные биоэкологические исследования Средней Сибири [Электронный ресурс]: материалы научно-практической конференции «БИОЭКО». – Электрон. дан. – Красноярск: Красн. гос. пед. ун-т им. В.П. Астафьева, 2019,-116с.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В литературе отсутствуют сопоставимые полученные на одной линии животных данные для сравнительного анализа протеомов бурой, бежевой и типично белой жировых тканей. Сведения о возрастной динамике имеются только для абдоминальной жировой ткани.

2. Для разделения и идентификации тканевых белков освоен метод ДСН-ПААГ электрофореза по Леммли. Использование программного обеспечения GelAnalyzer автоматизирует характеристику белков на электрофореграммах и повышает достоверность результатов.

3. Впервые на одной линии лабораторных мышей получены сведения о содержании и составе белков в трех основных типах жировых тканей при старении животных. Во всех тканях наблюдается снижение белка, уменьшается количество белковых полос при старении. Возрастные изменения протеома более выражены в бурой жировой ткани.

4. Разработаны организационные материалы к научно-исследовательской работе старшеклассника на тему: «Содержание и состав клеточных белков в жировых тканях при старении лабораторных мышей»: пояснительная записка, индивидуальный план, список литературы, иллюстрированное руководство «Белковый электрофорез».

Работа выполнена весной 2020 участницей 10 «Е» класса МАОУ «Средняя школы №153 и представлена на школьной конференции и получила направление на региональный этап. На конкурсе научно-исследовательских работ «Научный дебют» среди учащихся общеобразовательных организаций среднего общего образования г. Красноярска и Красноярского края на секции «Биология и экология» обучающаяся заняла 3 место.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Федеральный государственный образовательный стандарт основного общего образования (ФГОС СОО) Приказ Минобрнауки России от 17 мая 2012 г. № 413 (Электронный ресурс) – Режим доступа: <http://mosmetod.ru/metodicheskoe-prostranstvo/srednyaya-i-starshaya-shkola/russkij-yazyk/fgos/federalnyj-gosudarstvennyj-obrazovatelnyj-standart-srednego-obshchego-obrazovaniya-fgos-soo.html>. Дата обращения 13.02.2018
- 2.Акимов В. Аутбредные мыши //ИЦИГ [электронный ресурс] <http://www.spf-animals.ru/animals/mice/outbred/>
- 3.Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х., Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома// Ожирение и метаболизм.2004. № 1 . С. 34-45.
- 4.Бурый жир. Бурая жировая ткань / Публикации для учащихся. 18.07.2013. Режим доступа URL: <http://exam-ans.ru/fizika/8621/index.html?page=60> (дата обращения: 16.01.2020).
- 5.Елсукова Е.И. Бежевый адипоцит как инструмент локальной настройки температурного гомеостаза в тканях животных // Сложные системы в экстремальных условиях: принципы описания и моделирования. – Красноярск, 2018. – с. 3-13
- 6.Елсукова Е.И. Двухуровневая организация термогенеза жировых тканей // Журнал эволюционной физиологии и биохимии 2019. т.5, с. 339-345
- 7.Елсукова Е.И. Руководство к лабораторно-практическим занятиям по физиологии человека и животных: учебное пособие; Краснояр. Гос. Пед. Ун-т им. В.П. Астафьева. – Красноярск, 2015. – 151 с.
- 8.Замяткина М.А. Бурая жировая ткань в лабораторных моделях замедленного старения // Труды Томского университета – 2010. – Т. 275. - С.199-201.

- 9.Иванов К.П. Основы энергетики организма: Теоретические и практические аспекты. Том 3. Современные проблемы, загадки и парадоксы регуляции энергетического баланса. СПб Наука 2001г. 278 с.
- 10.Мазяркина Т.В., Первак С.В. Исследовательская деятельность школьников// современные наукоемкие технологии. 2011. №1. С. 121-123.
- 11.Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань. Молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза. – Красноярск: Амальгама, 2002. – 528 с.
- 12.Николаев Е. Н., Попов И. А., Кононихин А. С. Анализ пептидов и белков методами масс-спектрометрии высокого разрешения // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 11. С. 1051-1070.
- 13.Остерман В.Н. Электрофорез и ультрацентрифугирование. - М.: Изд-во Наука, 1981 - 288 с.
- 14.Паспорт национального проекта Наука // <http://government.ru/info/35565/>
- 15.Паспорт национального проекта Образование // <http://government.ru/info/35566/>
- 16.Протеомика. Режим доступа URL: <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-proteomika>
- 17.Семенов С.Е. Исследовательская деятельность школьников в лучших школах мира и России // Материалы всерос. Конф. Уч. Хим. 2014 [электронный ресурс] <http://chem.-teacher.ru?p=2744.html>.
- 18.Смирнова Н.З., Иванова Н.В., Голикова Т.В., Бережная О.В. Исследовательские работы учащихся по школьной биологии: учебное пособие. - Красноярск: КГПУ им. В.П. Астафьева, 2013 – 232с.
- 19.Стасевич К. Жир белый, бурый, бежевый // Наука и жизнь. 2014. №11. С.20-25.

- 20.Терешина Е.В. Возрастная дисфункция жировой ткани // Геронтология и гериатрия. 2010. №5ю С. 98-101.
- 21.Хохлов А.Р. Об участии РАН в совершенствовании школьного образования в интересах формирования научного кадрового потенциала страны // http://www.ras.ru/news/news_release.aspx?ID=79cd5144-210e-4401-92fe-195d86360b23
- 22.Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 277-359.
- 23.Carroll A., Haines L., Pearson T., Fallon P., Walsh C., Brennan C., Breen E., Porter R. Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 15534-15543.
- 24.Catherman A. Skinner O. Top-down proteomics: facts and perspectives // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 445. N 4. P 683-693
- 25.Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation // *Ann. Med.* 2011. V.43. P.104-115.
- 26.Cinti S. The adipose organ at a glance // *Dis Model Mech.* 2012. V. 5(5). P. 588–594.
- 27.Chabowska-Kita A., Kozak L. The critical period for brown adipocyte development: genetic and environmental influences // *Obesity (Silver Spring)*. 2016. V. 24. P. 283-290.
- 28.Elsukova E., Medvedev L., Mizonova O. Physiological features of perigonadal adipose tissue containing uncoupling protein UCP1 in ICR mice // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. P. 347-350.
- 29.[Florez-Duquet](#) M., Mc Donald R. M Cold-Induced Thermoregulation and Biological Aging // *Physiological Rev.* 2012. V.78, N2. P.38-341.
- 30.Forner F., Kumar C., Luber C. A., Fromme T., Klingenspor M, and Mann M, Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions // *Cell Metabolism.* 2009. V. 10. P. 324–335.

31. Giralt, M., Villarroya F. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? // *Endocrinology*. 2013. V. 154. P. 2992–3000.
32. Graja A., Schulz T. Mechanisms of aging-related impairment of brown adipocyte development and function // *Gerontology*. 2015. V. 61 P. 211–217
33. Kim S.-J.; Chae, S., Kim H., Mun D.-G., Back S., Choi H.Y. Park, K.S.; Hwang D., Choi S.H., Lee S.-W. A protein profile of visceral adipose tissues linked to early pathogenesis of type 2 diabetes mellitus // *Mol. Cell. Proteomics*. 2014. V. 13. P. 811–822.
34. Kleparnik K. Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: methodology and theory // *Electrophoresis*. 2015. N 36. P. 159-178
35. Jacobson L. Middle-aged C57BL/6 mice have impaired responses to leptin that are not improved by calorie restriction // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002. V. 282. P. E786-E793.
36. Jastroch M., Oelkrug R., Keipert S. Insights into brown adipose tissue evolution and function from non-model organisms // *J. Exp. Biol*. 2018. V. 221. doi: 10.1242/jeb.169425.
37. Jo J., Guo J., Liu T. Mullen S., Hall K.D. Cushman S.W., Periwé W. Hypertrophy-driven adipocyte death overwhelms recruitment under prolonged weight gain // *Biophysical Journal*. 2010. V. 99 P.3535-3544.
38. Kalinovich A., DeJong J, Cannon B., Nedergaard J. UCP1 in adipose tissue: two steps to full browning // *Biochimie*. 2017. Vol.134. P.127-137.
39. Kim E., Kim W., Oh K., Han B., Lee S. Recent advances in proteomic studies of adipose tissue // *Int.J. Mol. Sci*. 2015. V.16. P. 4530-4540.
40. Kozak L.P., Koza R., Anunciado-Koza R. Brown fat thermogenesis and body weight regulation in mice: relevance to humans // *International J Obesity*. 2010. V.

- 41.Li Y., Lasar D., Fromme T., Klingenspor M. White, brite, and brown adipocytes: the evolution and heater organ in mammals // *Journal of Canadian J. Zoology*. 2014. V. 92. №6. P. 615-626.
- 42.Müller S., Balaz M., Stefanicka P., Varga L., Amri L., Ukropec J., Wollscheid B., Wolfrum C. Proteomic Analysis of Human Brown Adipose Tissue Reveals Utilization of Coupled and Uncoupled Energy Expenditure Pathways // *Sci Rep*. 2016. V. 6 doi: 10.1038/srep30030
- 43.Nedergaard J., Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues // *Cell Metab*. 2014. V. 20. P. 396-407.
- 44.Panther.db. [Электронные ресурсы] Режим доступа: <http://www.pantherdb.org> (Дата обращения 15.04.2019).
- 45.Rogers N., Landa A., Park S., Smith R. Aging leads to a programmed loss of brown adipocytes in murine subcutaneous white adipose tissue // *Aging Cell*. 2012. V. 11. P. 2074-2083
- 46.Rosen, E.D., Spiegelman, B.M. What we talk about when we talk about fat // *Cell*. 2014. V. 156, P. 20-44.
- 47.Sanchez-Gurmachez J., Guertin D. Adipocyte Lineages: Tracing Back the Origins of Fat. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014, Vol. 1842 P. 340-351.
- 48.Shabalina I.G., Petrovic N., De Jong J., Kalinovich A., Cannon B., Nedergaard J. UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic // *Cell Reports*. 2013. V. 5. P. 1196-1203
- 49.Valle A., Sastre-Serra J., Roca P., Oliver J. Modulation of white adipose tissue proteom by aging and calorie restriction // *Aging Cell*. 2010. V. 9. P. 882-894.
- 50.Yamashita H, Yamamoto M, Ookawara T., Sato Y, Ueno N., Ohno H. Discordance between thermogenic activity and expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of old rats // *J. Gerontology: Biological Sciences*. 1994. V.

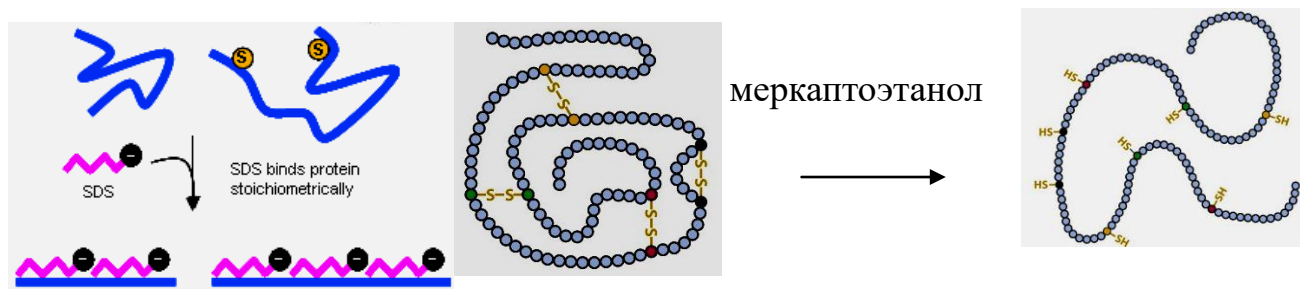
ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

Теоретические основы ПААГ белкового электрофореза

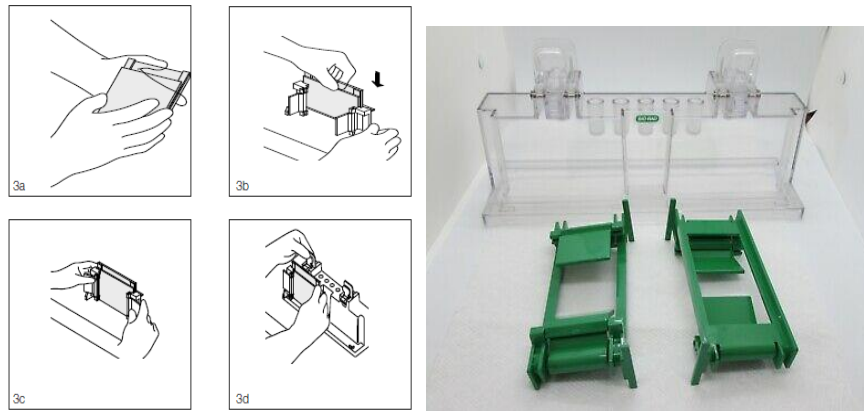
Электрофорез — метод разделения белков по их подвижности в геле, находящемся в электрическом поле. Подвижность зависит от суммарного электрического заряда белковой молекулы, от размера и формы молекулы, от характеристик внешнего электрического поля. Чем крупнее молекула, тем сильнее она тормозится при движении в геле, и тем меньше расстояние, на которое ей удастся переместиться. Чаще всего для разделения белковых молекул используется полиакриламидный гель. Он представляет молекулярное сито, образованное линейными цепями полимеризованного акриламида, которые химически сшиты между собой молекулами N, N метиленбисакриламида. Пористость геля зависит от концентрации акриламида[7].

Для характеристики белков по их молекулярным массам или для идентификации белков с известной молекулярной массой используется электрофорез в денатурирующих условиях. Агенты, вызывающие денатурацию белков – сильный ионный детергент додецилсульфат Na (ДСН или SDS сокращение от англ sodium dodecyl sulphate) (рисунок 6) и меркаптоэтанол. С большинством белков ДСН связывается в соотношении 1,4 мг на 1 мг белка. При этом отталкивание тесно расположенных на поверхности белка остатков серной кислоты приводит к нарушению четвертичной и третичной структур, распрямлению белковой глобулы, приобретению белками формы стержня с суммарным отрицательным зарядом, пропорциональным массе белка.

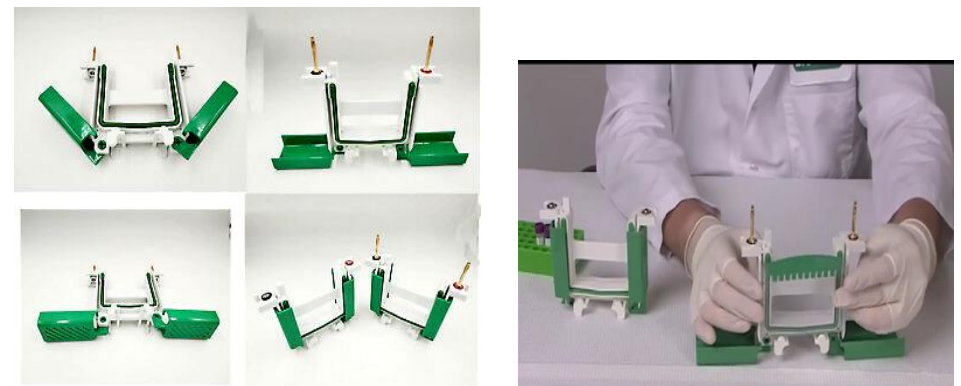


Пошаговая инструкция подготовки камер для гелей

1. Двойные стекла поместить в заливочную рамку и закрепить в заливочный столик, залить гели



2. Стекла с гелем закрепить в модуле для гелей

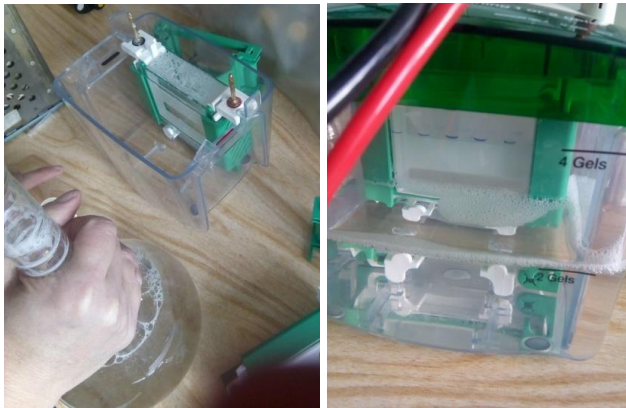


3. Вставить модуль с гелями в камеру



Иллюстрированное руководство «Белковый электрофорез».

1. Залить электродный буфер, предварительно в камеру до указанной на передней стенке отметки.

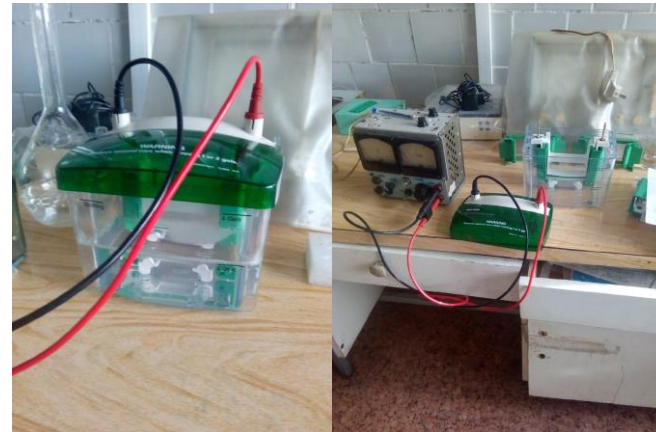


2. Пипеткой внести в кармашки раствор белков маркеров и анализируемые пробы



3. Подсоединить электроды к источнику питания.

Включить тумблер питания



4. Фиксация и окрашивание.



Приложение Г

Тезисы доклада Франц Ксении Алексеевны на школьном этапе
конференции «Научный потенциал Сибири» на базе МАОУ «Средняя школа
№153»

Здравствуйте, уважаемые участники конференции. Представляю вам доклад на тему: «Содержание и состав клеточных белков в жировых тканях при старении лабораторных мышей».

Жировая ткань, длительное время оставшаяся в тени научного прогресса, в первые десятилетия 21 века стала объектом пристального внимания биологов и медиков. Предполагают, что ее развитие, дифференцировка на белый энергозапасующий и бурый термогенный (т. е. продуцирующий тепло) и промежуточный бежевый типы предопределило интенсификацию энергетического обмена, переход к теплокровности и прогрессивное развитие мозга, органов чувств, скелетной мускулатуры у млекопитающих. Жировые ткани млекопитающих и человека представлены подкожным и абдоминальным депо, относительно небольшими висцеральными скоплениями белого и бежевого жира, скоплениями бурого жира. В последние годы в связи с открывающейся тесной функциональной взаимосвязью между разными типами жировых клеток и тканей их объединяют в единый жировой или адипозный орган.

У современного человека комфортные температурные условия с доступным и энергоемким питанием приводят к угнетению термогенеза в буром жире, росту депо белой жировой ткани. Предполагают, что чрезмерное запасание жиров нарушает метаболизм жировых клеток-адипоцитов как белого, так и бурого типов, повышает продукцию токсичных для окружающих тканей и органов токсичных свободных радикалов кислорода и в конечном счете приводит к серьезным заболеваниям, объединенным общим названием «метаболический

синдром». Метаболический синдром по сути включает в себя свойственные современным пожилым болезни старения.

Поскольку именно белки (ферменты, мембранные транспортеры, цитоскелетные, сигнальные и многие другие белки) выполняют все виды работ в клетках, по праву считаются «главными действующими лицами» в ней. Важным шагом к пониманию механизмов нарушений функционирования адипоцитов при старении является сравнительный анализ их протеомов. Протеом – набор синтезируемых клеткой данного типа белков, может меняться в зависимости от стадий клеточного цикла, от возраста и функционального состояния зрелой клетки. Один из современных методов изучения протеома – разделение клеточных белков в электрическом поле (электрофорез).

Мы предполагаем, что с увеличением возраста лабораторных мышей в адипоцитах всех видов жировых тканей изменяется содержание и состав белков.

Целью научно-исследовательской работы был анализ содержания и состава белков жировых тканей у молодых и старых лабораторных мышей. Задачи представлены на слайде.

Работа выполнена на базе лаборатории биохимии и физиологии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева. Исследования проводили на самках мышей линии ICR. Возрастные группы формировались в соответствие с возрастной периодизацией жизни мышей, разработанной Джексоновской лабораторией. Возраст около 3-3,5 мес. соответствует прекращению роста тела в длину, возраст 12 мес. – пожилые мыши (примерно соответствуют возрасту 50 лет у человека). В ходе морфометрического анализа регистрировали показатели абсолютной и относительной массы межлопаточного бурого жира и пахового, окологонадного белого жира. Пробы жировых тканей взвешивали на весах. Относительную массу рассчитывали в процентах от массы тела.

Сведения о содержании жировых тканей у старых мышей ICR отсутствуют в литературе. При старении масса тела мышей увеличивалась почти в 2 раза. Соответственно абсолютная масса всех трех жировых тканей была также увеличена. Однако при расчете этого показателя в % относительно массы тела установлено, что масса бурого и пахового жира изменилась незначительно, наибольший десятикратный прирост отмечен для самого внутрибрюшного гонадного жира. Полученные данные согласуются с данными литературы по возрастной динамике веса жировых тканей при старении животных и человека.

В обеих возрастных группах животных наиболее обогащена белком была бурая жировая ткань, это связано с повышенным содержанием в ней митохондрий, продуцирующих тепло за счет окисления липидов. У старых мышей содержание белка снижалось и в буром жире и в белом жире. Уменьшение доли тканевого белка, по-видимому, отражает увеличение размеров липидных капель из-за ослабления терморегуляторного термогенеза, из-за снижения потребности в липидах других тканей организма.

В пробах бурого жира 3-месячных мышей выявлено 17 белковых полос с молекулярными массами в диапазоне 20-252кДа. Наибольшую интенсивность, которая пропорциональна количеству белка, имели полосы, содержащие белки с молекулярными массами 252кДа. У старых животных количество выявленных белковых полос было ниже, отсутствовали полосы с молекулярными массами 144,88,22,20кДа. При анализе интенсивности не наблюдалось существенных изменений.

В пробах пахового жира у молодых мышей выявлено 6 белковых полос, в отличие от старых отсутствует белковая полоса с молекулярной массой 27кДа. В пробах гонадного жира у 3-месячных мышей выявлено 7 белковых полос с молекулярными массами в диапазоне 20-154кДа. У 12-месячных мышей отсутствует полоса с молекулярной массой 154кДа.

Таким образом, абсолютная и относительная масса жировых тканей зависит от возраста. При старении мышечной абсолютная и относительная масса жировых тканей всех типов возрастает. Прирост массы выше для абдоминальной белой жировой ткани. Содержание общего белка в бурой жировой ткани выше по сравнению с белой жировой тканью. При старении животных общий белок снижается. Наиболее значительные изменения развиваются в белой жировой ткани. Разнообразие белков выше в бурой по сравнению с белой жировой тканью. Изменение состава белков в жировых тканях при старении указывает на перестройку метаболических процессов.

*Опубликованные научные статьи по теме исследования***ПРИЕМЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ БЕЛКОВ
ПРИ ПРОТЕОМНОМ АНАЛИЗЕ****TECHNIQUES OF THE FUNCTIONAL PROTEIN CLASSIFICATION
IN PROTEOMIC ANALYSIS**

Е.К. Гусева

E.K. Guseva

Научный руководитель Е.И. Елсукова
*Scientific Director E.I. Elsuikova**Протеом, экспрессия белков, биоинформатика.***В статье рассматриваются проблемы функциональной классификации белков тканевых протеомов при использовании современных компьютерных классификационных систем.***Proteom, protein expression, bioinformatics.***The article is devoted to the problems of functional classification of tissue proteome proteins using modern computer classification systems.**

Протеомный анализ – новое, быстро развивающееся направление постгеномной биологии. Поскольку белки – главные действующие лица любого биохимического процесса, выяснение состава экспрессируемых белков, количественные показатели их экспрессии в ткани дает всестороннюю достоверную картину происходящих изменений в онто- и филогенезе, при различных экспериментальных воздействиях. Лимитирующим фактором в протеомном анализе является функциональная характеристика и классификация белков с измененной экспрессией. Во-первых, изменения часто затрагивают сотни белков, во-вторых, сведения о многих открытых параллельно с расшифровкой генома белках крайне малочисленны. Наиболее полная информация о белках и их генах, предоставляемая в свободное пользование, собрана в базе данных UniProt, курируемой несколькими крупными институтами биоинформатики в Европе и США. Функциональные характеристики белков, их субклеточная локализация, белок-белковые взаимодействия представлены в разделе UniProtKB/SwissProt. Чтобы облегчить работу по классификации сотен белков с измененной экспрессией в последнее время разрабатываются специальные компьютерные программы. Одна из них, Panther (Protein analyses through evolutionary relationships), в сети Интернет находится в свободном доступе. Panther классифицирует белки в анализируемом протеоме по молекулярной функции, биологическим процессам, клеточной локализации, метаболическим и сигнальным путям [URL].

Целью данной работы была апробация компьютерной классификационной системы Panther при сравнительном протеомном анализе подкожной жировой ткани аутбредных мышей. Контрольная группа содержалась при стандартных условиях (температура 23 °С и свободный доступ к корму); опытная группа в те-

чение 2 месяцев подвергалась ежедневным 8-часовым экспозициям при 5 °С в сочетании с 20 %-й пищевой рестрикцией.

Перечень идентифицированных в образцах жировой ткани после масс-спектрометрии белков был предоставлен в виде Excel файла. В файле представлены наименования белков и их генов в соответствии с UniProtKB/SwissProt и значения сигналов с масс-спектрометра по всем исследованным пробам контрольных и опытных мышей. Для выявления белков с различным содержанием в пробах ткани контрольных и опытных животных использовался непараметрический критерий Манна–Уитни. Сравнение проводили с помощью компьютерной программы Статистика 6. Белки с различающейся более чем в 2 раза экспрессией у контрольных и опытных мышей делили на группы гипер- и гипозэкспрессированных. Перечень наименований генов каждой группы в дальнейшем отдельно вносили в ID лист в Panther и анализировали по клеточной локализации и по биологическим процессам. Кроме того, белки классифицировали «вручную», используя функциональные аннотации в базе данных SwissProt UniProtKB.

Статистически значимые различия в экспрессии обнаружены для 396 белков. Среди них 16 белков присутствовали только в опытной группе. Интенсивность сигналов от 80 белков в опытной группе была выше в 2 и более раз. Таким образом, в гиперэкспрессированной группе было 96 белков. Группа гипозэкспрессированных белков содержала 54 белка со сниженным в 2 и более раз сигналом. Известно, что холодовые воздействия и умеренная пищевая рестрикция стимулируют рост численности бежевых термогенных адипоцитов в подкожном жире [Shabalina et al., 2013; Елсукова, 2018]. Действительно, только у опытных мышей во всех пробах присутствовал основной термогенный маркер бурых и бежевых адипоцитов – разобщающий белок UCP1. Чтобы проверить, подкреплена ли функционирование этого белка процессами митохондриального окислительного катаболизма, в программе Panther задавали классификацию гиперэкспрессированных белков по клеточным компонентам. Программа смогла указать локализацию в клетке только 55 из 96 белков, в том числе 23 белка были опознаны как митохондриальные. К этим митохондриальным белкам можно добавить из присутствующего в отчетном листе столбца Gene name/Gene Symbol еще 20 белков, в наименовании которых указывается митохондриальная локализация. Дополнительный поиск в базе данных UniProtKB выявил еще 7 митохондриальных белков. Таким образом, процентное содержание митохондриальных белков в группе гиперэкспрессированных белков составляло от 41 до 52 % при поиске с помощью компьютерной программы и при некомпьютерном поиске в базе данных соответственно.

При задании поиска по биологическим процессам ставилась задача обнаружить белки ЭТЦ. Всего программа распознавала 57 белков, из которых 14 были отнесены к ЭТЦ, среди них UCP1 и 13 белков дыхательных комплексов. «Ручной» поиск по базе UniProt выявил 22 белка ЭТЦ в гиперэкспрессированной группе. Как и в предыдущем случае, процентное содержание искомым белков в общей группе практически не отличалось при некомпьютерном поиске (23 %) и при поиске с помощью программы Panther (24 %).

Таким образом, несмотря на неполную идентификацию протеома жировой ткани программой Panther, основные тренды его изменений этой программой указываются верно. Кроме того, компьютерный анализ все-таки существенно снижает объем «ручного» поиска белков в базе данных. К недостаткам Panther можно отнести трудности с графической визуализацией результатов, несмотря на наличие интерфейса, позволяющего представлять результаты в виде столбчатых и круговых диаграмм. При их использовании существенно снижается как объем идентифицируемых генов и белков, так и верность их классификации. Например, белки дыхательных комплексов идентифицируются как белки плазматической мембраны.

В целом результаты функциональной классификации белков подкожной жировой ткани с измененной экспрессией свидетельствуют о выраженной стимуляции митохондриогенеза. Судя по составу митохондриальных гиперэкспрессированных белков, преобладало окисление жирных кислот, энергия протонного градиента использовалась и для термогенеза и для процессов роста и выживания. Среди белков со сниженной экспрессией преобладали белки внеклеточного матрикса.

Библиографический список

1. Елсукова Е.И. Бежевый адипоцит как инструмент локальной настройки температурного гомеостаза в тканях животных // Сложные системы в экстремальных условиях: принципы описания и моделирования. Красноярск, 2018. С. 3–13.
2. Shabalina I.G., Petrovic N., De Jong J., Kalinovich A., Cannon B., Nedergaard J. UCP1 in Brite / Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic // Cell. Reports. 2013. Vol. 5. P. 1196–1203.
3. URL: <http://www.pantherdb.org> (дата обращения: 15.04.2019).

ПИЩЕВЫЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ ICR НА ДИЕТЕ КАФЕТЕРИЯ

FOOD PREFERENCES OF ICR LABORATORY MICE ON A CAFETERIA DIET

А.К. Гаджиева, Е.К. Гусева

A.K. Gadgieva, E.K. Guseva

Научный руководитель М.И. Якушина
Scientific adviser M.I. Yakushina

Пищевые предпочтения, диета кафетерия, соматометрические показатели.

Исследованы пищевые предпочтения самок и самцов аутбредных лабораторных мышей, получающих диету кафетерия. В течение первого месяца эта диета не влияла на соматометрические показатели.

Food preferences, cafeteria diet, somatic parameters.

The food preferences of females and males of outbred laboratory mice receiving cafeteria diet were investigated. During the first month, this diet did not affect somatometric indicators.

Мышь – лабораторная модель человека. Эксперименты на мышах помогают понять, как работает в разных условиях здоровый и больной организм, разобраться в причинах заболеваний. В современной медицине не большое внимание уделяют метаболическому синдрому, объединившему несколько тяжелых заболеваний, зачастую развивающихся параллельно. К ним относятся алиментарное ожирение, сахарный диабет 2-го типа, дистрофические изменения печени, атеросклероз, гипертензия [Резник, 2018]. По мнению ученых, быстрое распространение метаболического синдрома даже среди молодых людей связано с интенсивным развитием пищевой индустрии, доступностью и высокими вкусовыми качествами пищи и переизбытком. Мыши, получающие вместе со сбалансированным кормом продукты рациона современного человека с высоким содержанием жиров и углеводов (диета кафетерия), быстро набирают вес и демонстрируют нарушения обмена веществ [Медведев, Елсукова, 2002]. Причем недавно было показано, что нарушения обмена веществ неодинаковы у самок и самцов мышей [Федосеева, 2018]. В связи с этим возникло предположение, что выбор пищевых продуктов из предлагаемого животным рациона кафетерия может отличаться у самок и самцов.

Целью работы был анализ пищевых предпочтений самок и самцов лабораторных мышей линии ICR.

Животные – самцы и самки аутбредной линии ICR, приобретенные в питомнике ГНЦ ВБ «Вектор» в возрасте 45 суток, содержались в виварии КГПИУ при 23 С. Контрольная группа имела свободный доступ к сбалансированному корму для лабораторных грызунов (БиоПро, Новосибирск) и воде. В рацион экспери-

ментальных мышей (группы самок и самцов), помимо стандартного корма, добавляли свиное сало, сладкое печенье и молочный шоколад. Перед началом эксперимента все животные в течение недели адаптировались к новым условиям и получали только стандартный корм. Продолжительность эксперимента составила 26 суток. В начале и в конце эксперимента мышей взвешивали, определяли назо-анальную длину и рассчитывали индекс массы тела. Ежедневно определяли количество съедаемых продуктов. Эксперимент проведен в марте-апреле 2019 г. Статистическую значимость различий между группами животных оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Перед началом эксперимента масса тела, индекс массы тела, потребление стандартного корма практически не различались между группами самцов и самок. Масса тела мышей составляла около 24 г, суточное потребление корма – около 5 г/мышь. При предъявлении диеты кафетерия произошло существенное снижение последнего показателя, но не в равной степени у самок и самцов. Самки снизили потребление стандартного корма более чем в 2 раза, самцы только в 1,5 раза. Из новых продуктов мыши обоих полов предпочитали печенье. Потребление печенья самцами было примерно в 1,5 раза выше, чем у самок. Такая же закономерность наблюдалась для свиного сала. Молочный шоколад, наоборот, самцы практически не употребляли. Переход к кафетерийному рациону увеличил энергетическую ценность питания на 40% у самок и в 2 раза у самцов. Изменилось и соотношение белков, жиров и углеводов. У самок при переходе на рацион кафетерия снизилось на 41% потребление белков, увеличилось более чем в 4 раза потребление жиров, в 2 раза потребление углеводов. Самцы практически не снизили потребление белка, но в 8 раз увеличили потребление жиров.

Потребление стандартного корма и предоставляемых продуктов питания самками и самцами мышей ICR

Предоставляемые продукты	Самки, n=6 г/мышь	Самцы, n=5 г/мышь
Стандартный корм, г/сут.	2±0,4	3,6±0,6*
Печенье, г/сут.	1,22±0,3	1,89±0,4
Шоколад, г/сут.	0,4±0,2	0,1±0,04*
Сало, г/сут.	0,5±0,1	0,72±0,2
Белки, г/сут.	0,50	0,9
Жиры, г/сут.	0,78	1,7
Углеводы, г/сут.	1,4	1,29
Энергетическая ценность, ккал/сут.	16,84	24,17

Примечание: * – статистическая значимость различий между самками и самцами.

С учетом более высокой энергетической ценности питания можно было ожидать более значительную прибавку веса у опытных животных, особенно у самцов по сравнению с самками. К концу эксперимента различия между контрольными группами, между опытными самками и самцами отсутствовали. Также ни

в одной группе животных не изменился индекс массы тела, т.е. прирост массы был пропорционален росту тела в длину. Выяснение факторов, препятствующих повышенному росту жировых депо у мышей, получающих в течение месяца продукты из диеты кафетерия, будет предметом наших дальнейших исследований.

Библиографический список

1. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань человека // Успехи физиологических наук. 2002. Т. 33. С. 17–29.
2. Резник Н.Л., Большой плюс или жирный минус // Химия и жизнь. 2018. №1: сайт. URL:https://elementy.ru/nauchpopulyarnaya_biblioteka/433961/Khimiya_i_zhizn_1_2018
3. Федосеева А. Ученые установили, что лечение ожирения у женщин и мужчин будет отличаться: сайт. URL: <http://www.sib-science.info/ru/institutes/uchenye-vyyasnili-cto-lechenie-ozhireniya-u-muzhchin-05122018>

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЖИРОВЫХ ТКАНЕЙ БУРОГО И БЕЛОГО ТИПОВ У АУТБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ICR (ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

VTNFBOLIC ACTIVITY OF BROWN AND WHITE ADIPOSE TISSUE
IN OUTBRED MICE ICR (PROSPECTIVE INVESTIGATION)

А.А. Трегузов, Е.К. Гусева

A.A. Tregusov, E.K. Guseva

Научный руководитель Е.И. Елсукова
Scientific Director E.I. Elsuкова

Буряя и белая жировые ткани, тканевой белок, обводненность.

В работе впервые выполнен сравнительный анализ метаболической активности подкожных, абдоминальных и висцеральных скоплений бурой и белой жировой ткани по содержанию в них тканевого белка на одной линии мышей ICR.

Brown and white adipose tissue, common protein, water content.

For the first time on one line mice ICR a comparative analysis of tissue protein was performed in subcutaneous, abdominal and visceral depots of brown and white adipose tissue of outbred ICR mice.

В последние годы жировые ткани (ЖТ) – объект пристального внимания со стороны биологов и медиков. Их эволюционное развитие сделало возможным интенсификацию энергообмена, появление терморегуляторной теплопродукции и тем самым становление гомойотермии [Jastroch et al., 2018]. ЖТ принадлежит ключевая роль в инициации метаболического синдрома у человека и домашних животных [Cinti, 2012]. ЖТ млекопитающих представлены подкожным и абдоминальным жировыми депо, скоплениями типичного бурого жира (БЖ), относительно небольшими скоплениями вокруг многих органов или даже в их структуре висцеральной жировой ткани (ВисцЖ) [Cinti, 2012]. Широкая локализация жировых тканей в организме сочетается с высокой клеточной гетерогенностью. Кроме трех основных типов адипоцитов? выделяют подтипы, отличающиеся по происхождению, составу транскриптома, протеома, секретома [Елсукова, 2019]. Соотношение разных типов и подтипов адипоцитов неодинаково в разных скоплениях ЖТ даже одного депо. Таким образом, понимание механизмов нормального и патологического функционирования «жирового органа» и его реакций на разные воздействия требует одновременного изучения разных жировых скоплений. В настоящее время имеется только одна работа, где на одной линии мышей проведен анализ экспрессии маркеров бурого, бежевого и белого типов адипоцитов в разных ЖТ [De Jong et al., 2015]. Сведения о метаболической активности ЖТ крайне разрозненны. Целью данной работы был сравнительный анализ содержания тканевого, белка как интегрального показателя метаболической активности, в разных ЖТ аутбредных мышей ICR.

В исследовании использованы 12-недельные самки, содержащиеся при 23 °С, со свободным доступом к воде и сбалансированному гранулированному корму (БиоПро, Новосибирск). Белок в тканевых гомогенатах определяли модифицированным методом Лоури [Елсукова и др., 2016].

В соответствии с данными литературы самые крупные скопления типичного БЖ локализованы в межлопаточной и в подмышечных областях (рис. 1). Шейное скопление организовано в виде 2 пар полосок, легко идентифицируемых между мышечными слоями. Его масса в 4 раза меньше массы межлопаточного БЖ. Содержание тканевого белка варьировало от 100 в подмышечном до 150 мкг/мг в межлопаточном БЖ. Для сравнения: содержание общего белка в межлопаточном БЖ самцов меньше полученных нами результатов в 1,5–2 раза [Елсукова и др., 2016; Мизонова и др., 2014]. Белую жировую ткань (БелЖ) выделяли из самого крупного пахового скопления подкожного депо; в абдоминальном депо отдельно выделяли и исследовали гонадное скопление вдоль рогов матки и вокруг яичников, подпочечное ретроперитонеальное скопление, а также околоселезеночное и мезентериальное скопление. Подкожное жировое депо иногда относят к бежевой ЖТ [De Jong et al., 2015]. У исследованных нами животных паховый жир ни по морфологии, ни по содержанию тканевого белка не проявлял повышенной метаболической активности. Содержание белка в нем, как и в гонадном и ретроперитонеальном скоплениях абдоминального депо, было в 10 раз меньше, чем в межлопаточном БЖ. В то же время розоватые оттенки в цветовой гамме и практически не отличающийся от показателей БЖ тканевой белок были обнаружены в мезентериальном и околоселезеночном жире. Эти данные требуют проверки, так как не согласуются с приводимыми в литературе сведениями о мезентериальном жире как типичном БелЖ [Cinti, 2012].

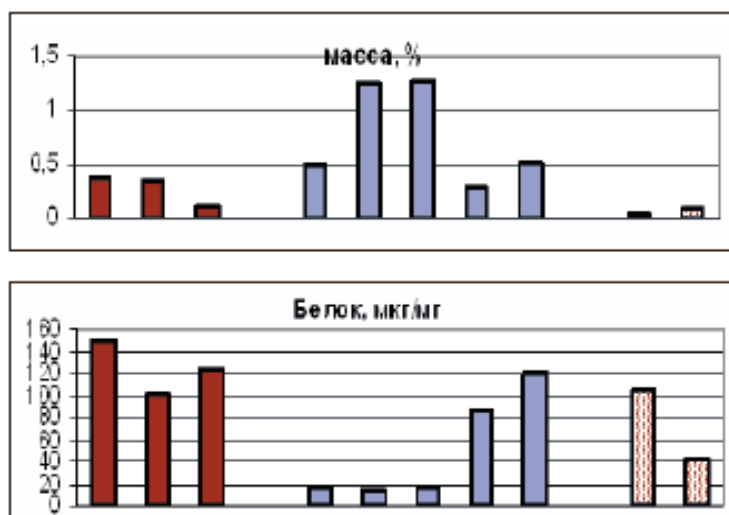


Рис. 1. Масса и содержание тканевого белка в жировых тканях самок аутбредных мышей ICR

Примечание: слева направо представлены межлопаточный, подмышечный, шейный БЖ (темные столбики), паховый, гонадный, ретроперитонеальный, мезентериальный, околоселезеночный БелЖ (серые столбики), тимусный и околосаливарный ВисцЖ (столбики со штриховкой).

ВисцЖ визуально идентифицировался вдоль спинной аорты, на задней поверхности долей тимуса. Неописанное в литературе небольшое скопление ВисцЖ локализовано между подчелюстными слюнными железами. По слабо буроватому оттенку цвета и повышенному по сравнению с типичным БелЖ содержанию белка эти ткани можно предварительно отнести к бежевому типу, однако для окончательных выводов требуется определение термогенных маркеров.

Таким образом, проведенное исследование позволило предварительно идентифицировать у самок мышей ICR основные скопления ЖТ разных типов и ранжировать их по метаболической активности

Библиографический список

1. Елсукова Е.И. Бежевый адипоцит как инструмент локальной настройки температурного гомеостаза в тканях животных // Сложные системы в экстремальных условиях: принципы описания и моделирования. Красноярск, 2018. С. 3–13.
2. Елсукова Е.И., Медведев Л.Н., Мизонова О.В. Физиологические особенности окологонадного жира, содержащего разобщающий белок UCP1, у мышей линии ICR // БЭБиМ. 2016. Т. 161, №3. С. 321–324.
3. Мизонова О.В., Елсукова Е.И., Медведев Л.Н. Энергообмен и биохимические особенности жировых тканей мышей линии ICR в условиях продолжительного ограничения питания // БЭБиМ. 2013. Т. 155, № 6. С. 706–709.
4. Cinti S. The adipose organ at a glance // *Dis Model Mech.* 2012. Vol. 5. P. 588–594.
5. De Jong J., Larsson O., Cannon B., Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers // *Am. J. Physiol.* 2015. V. 308. P. E1085–E1105.
6. Jastroch M., Oelkrug R., Keipert S. Insights into brown adipose tissue evolution and function from non-model organisms // *J. Exp. Biol.* 2018. Vol. 221. DOI: 10.1242/jeb.169425

