

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

Лаптева Мария Игоревна

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Тема: Проектирование исследовательской работы школьников по теме
«Физиология адаптации к пищевым и температурным факторам»

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

Е.Антипова (дата, подпись)

Руководитель Елсукова Елена Ивановна

Е.Елсукова канд. биол. наук, доцент

Обучающийся

Дата защиты 24.06.2017

Лаптева Мария Игоревна

М.И.Лаптева (дата, подпись)

Оценка отлично
(прописью)

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3-4	
ГЛАВА 1. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ПРОЕКТЫ УЧАЩИХСЯ НА БАЗЕ НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ ВУЗОВ		
1.1. Особенности исследовательская деятельность учащегося.....	5-7	
1.2. Организация исследовательской деятельности при научных лабораториях ВУЗов	7-11	
ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМАТИКЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРОЕКТОВ		
2.1. Физиология жировых тканей.....	12-14	
2.2. Возрастные изменения бурой и белой жировых тканей. Метаболический синдром.....	14-17	
2.3. Влияние пищевой рестрикции, низких температур на жировые ткани животных.....	17-21	
ГЛАВА 3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ		
3.1. Объекты и методы исследования.....	22-23	
3.2. Предварительные результаты по теме проектов, предлагаемых школьникам.....	23-29	
3.3. Влияние курса регулярных холодовых экспозиций на свойства жировых тканей и углеводный обмен животных.....	29-30	
3.4. Сочетанное влияние регулярных холодовых экспозиций и ограничения кормов на свойства жировых тканей и углеводный обмен животных.....	30-33	
ГЛАВА 4. Разработка материалов и основных этапов исследовательской работы учащегося.....		34-40
Выводы.....	41-42	
Список литературы.....	43-47	

Введение

Одним из важных условий поступательного развития российской науки является постоянный приток молодежи, поэтому поиск школьников старших классов не просто увлеченных, а мечтающих о карьере ученого, их прикрепление к вузовской или академической научно-исследовательской лаборатории, стало одним из приоритетных направлений профориентационной работы. Различные конференции, олимпиады, летние школы является разнообразными формами работы с увлеченными учениками.

Особый интерес вызывает прикрепление наиболее способных учащихся к вузовским лабораториям, что позволяет профессионально ориентировать ребенка в сфере науки. Привлечение к несложной экспериментальной работе в лаборатории позволяет раскрыть его потенциал, углубить и расширить знания по биологии. Для того, чтобы учащийся легко влился в коллектив, чувствовал себя там комфортно, осознавал свой вклад в общую работу, необходимо тщательно проработать план его деятельности.

Такой опыт работы имеется у лаборатории физиологии и биохимии энергообмена КГПУ им. В.П. Астафьева. Основное направление исследований лаборатории связано с метаболической и терморегуляторной функциями жировых тканей, участием жировых тканей в температурных и пищевых адаптациях животных и человека. Актуальность исследований обусловлена значительным и повсеместным ростом в последние годы частоты метаболического синдрома – комплексного нарушения обменных процессов, включающего резистентность к лептину, абдоминальное ожирение, резистентность к инсулину, дислипидемию, атеросклероз. Знание тонких механизмов адаптивных перестроек белой и бурой жировых тканей необходимо для преодоления их дисфункции и коррекции метаболического синдрома.

Цель данной работы - проектирование исследовательской работы школьников по теме «Физиология адаптации к пищевым и температурным факторам».

Задачи:

1. Анализ современного состояния проблемы адаптивного ремоделирования жировых тканей при действии пищевых и температурных факторов

2. Предварительные экспериментальные исследования влияния низкотемпературных экспозиций и умеренной пищевой рестрикции на энергетический и пластический обмен в жировых тканях лабораторных мышей

3. Разработка тем исследовательских проектов учащихся и апробация одной из них

ГЛАВА 1. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ ПРОЕКТЫ УЧАЩИХСЯ НА БАЗЕ НАУЧНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ ВУЗОВ

Важность поиска “одаренных” детей и их привлечение к научно-исследовательской деятельности не отменяет тот факт, что основной деятельностью ребенка в это время является школа. Исходя из этого в научно-педагогической литературе исследовательские проекты рассматриваются как вспомогательный элемент в учебно-воспитательном процессе школы [1]. Тем не менее, учитывая современные тенденции в развитии общественной жизни, информатизацию общества, исследовательская деятельность учащихся с каждым годом приобретает все большее значение как средство обучения самостоятельному поиску информации, работе с литературой, развитию способности продуктивно организовать свою работу, умения проектировать ближайшую и дальнюю перспективу, умения найти и привлечь необходимые ресурсы, наметить план работы и, выполнив его, достичь поставленной цели.

1.1. Общие положения исследовательская деятельность учащегося.

Самостоятельная работа учащихся активно изучается отечественными и зарубежными психологами и педагогами, которые утверждают, что осознание материала происходит через разные виды самостоятельной деятельности. Исследования по психофизиологии обучения показывают, что учащиеся способны сохранить в памяти примерно: 10 % из того, что читали; 20 % из того, что слушали; 30 % из того, что наблюдали; 50 % из того, что видели и слышали; 70 % из того, что высказывали и обсуждали; 90 % из того, что высказывали и практически выполняли [5]. Из этого можно сделать вывод, что наиболее эффективным видом самостоятельной деятельности школьников является исследовательская деятельность. Не случайно в стандарте об образовании

исследовательская и проектная деятельность рассматриваются как обязательные для освоения учащимися в ходе учебного процесса [23].

Л.С. Выготский понимал под исследовательской деятельностью - деятельность учащихся под руководством педагога, связанная с решением учащимися творческой, исследовательской задачи с заранее неизвестным решением и предполагающая наличие основных этапов, характерных для научного исследования [7].

В процессе такой деятельности школьник должен освоить различные виды деятельности по получению новых знаний по данному предмету, уметь применить эти знания на практике, так же в ходе исследовательской и проектной работы будут формироваться научный тип мышления, научное представления о ключевых теориях, владение терминологией, основными понятиями и методами [11]. Поэтому исследовательская и проектная деятельность становится все популярнее в современных школах, так как позволяет не только расширить и углубить базовые знания учащихся по предмету, но и способствует развитию их самостоятельной работы. В результате такой работы развивается личность ученика, способность творчески мыслить, умение осваивать новые виды деятельности и применять их на практике.

При данном виде деятельности особенную специфику имеет взаимодействие учащегося с педагогом. Деятельность школьника направлена на выполнение ряда задач, таких как выдвижение гипотезы, формулирование проблемы, планирование своей исследовательской деятельности, работа с научной литературой, затем проверка гипотезы в ходе практической работы, получение результатов и формулирование выводов. Педагог же в свою очередь, лишь управляет процессом освоения новых знаний учащимся, направляет, консультирует по необходимым вопросам и не в коем случае не делает работу за него [12]

Выполнение исследовательской деятельности подразумевает наличие у школьников базовых знаний, а именно понятийного аппарата,

представление о самом исследовательском процессе и, конечно же непосредственное участие в самой научно-исследовательской работе [18]. В первый этап работы по приобретению учащимся новых знаний можно выделить самостоятельную работу с литературой. Вторым этапом реализуется непосредственно через реализацию новых знаний в ходе научно-исследовательской деятельности.

Таким образом, исследовательская деятельность позволяет достичь, одной из важнейших целей обучения - научить учащихся самостоятельно получать новые знания, уметь решать поставленные проблемы, выдвигать и доказывать гипотезы, планировать свою деятельность, чтобы по итогу достигнуть поставленной цели.

Наряду с исследовательскими проектами, выполняемыми на базе школы, носящими массовый характер, не учитывающими или слабо учитывающими профессиональные ориентации старшеклассника, успешно развиваются особенно в последние годы такое направление как работа над исследовательским проектом на базе научной лаборатории академического института или вуза. На сегодняшний день этот вид исследовательской деятельности школьников слабо проанализирован и в отечественной и в зарубежной литературе, хотя погружение подростков и юношей в мир науки, безусловно, имеет свою специфику.

1.2. Особенности исследовательской деятельности при научных лабораториях ВУЗов

Значение выполнения такого проекта для старшеклассника, наряду со всем вышеперечисленным, это, возможность почувствовать себя полноправным участником той среды, в которой он планирует реализовать свой профессиональный и творческий потенциал. Поэтому очень важно, чтобы старшеклассник оказался прикрепленным не к любой лаборатории, а к такой, направления деятельности которой максимально совпадают с его интересами и планами на будущее. Вузовская научная среда по сравнению

с академической может оказаться предпочтительнее для адаптации старшеклассника, потому что в ней присутствуют студенты, вчерашние школьники, более тонко чувствующие проблемы адаптации ребенка к взрослой профессиональной среде [19].

Необходимым условием адаптации является высокий уровень школьных знаний, иначе высок риск, что увлечение подростка наукой вместо углубления и расширения знаний приведет к хроническому отставанию в школе [18].

На начальном этапе школьник может выполнять разовые несложные и разноплановые поручения. Этот этап позволяет школьнику утвердиться в своем выборе. Длительное застревание на этом этапе может привести к утрате интереса у способного школьника. Поэтому особого внимания заслуживает предварительная разработка материалов и основных этапов исследовательской работы учащегося и ее согласование и обсуждение с самим школьником [13].

Хотя проект будет обсуждаться с руководителем, чтобы это обсуждение прочно зафиксировалось в сознании учащегося, желательным документом является пояснительная записка с формулировкой актуальности, новизны, гипотез, четких целей и конкретных задач, стоящих перед учащимся. Пояснительная записка может быть предоставлена ученику как до, так и после обсуждения. Важным этапом, предшествующим самому исследованию, является знакомство с освещением проблемы в литературе. Обычно ребенок сам просит предоставить ему литературу, информационные сайты. У современного школьника с крайне высокой учебной нагрузкой нет времени для серьезного научного поиска, к тому же он не владеет необходимыми знаниями для такого поиска. Поэтому не просто желательно, а необходимо иметь небольшой список литературы, адаптированный к возрасту, знаниям учащегося. Работа с научной литературой предполагает не просто ознакомительное чтение. Эта работа будет полезной, если ее результатом

станет конспектирование основных положений, неважно в письменной или электронной форме. Учащемуся неизбежно встретятся научные термины, с которыми он не был знаком ранее, следовательно, необходимо продумать составление терминологического словаря. Необходимо поощрять инициативу школьника по поиску дополнительной литературы.

Хотя освоение требуемой для выполнения проекта экспериментальной методики, как и сам эксперимент, требует постоянного контроля взрослых, все же желательно не просто объяснить и продемонстрировать все необходимые манипуляции. Работа даже с самым простым устройством, прибором требует большой внимательности, постоянного контроля своих действий [13]. Желательно иметь всегда при себе инструкции к приборам, наборам реактивов и пр.

Не менее важным этапом исследовательской работы является анализ результатов. Безусловно, знания ученика недостаточны для проведения статистического анализа. В тоже время по силам старшекласснику представить данные в виде средних и стандартных отклонений, это позволит наглядно представить понятие статистической значимости различий экспериментальных групп [11]. По силам старшекласснику выполнить в информационной среде Microsoft excel аппроксимацию зависимости регрессионной кривой. Такой несложный анализ, к тому же продемонстрирует ребенку тесную связь современной биологии с математикой и информатикой.

Заключительным этапом исследования является представление и защита полученных результатов. Поэтому школьнику очень важно владеть такими видами речевой деятельности как: умение общаться с незнакомой аудиторией, грамотное формулирование своей мысли, умение донести и отстаивать свою позицию.

Таким образом, по продолжительности работа школьника над проектом при вузовской лаборатории является долгосрочной, выполняется индивидуально, во внеурочное время в течение всего учебного года.

Выше перечисленные этапы работы школьника над научным проектом резюмированы в таблице 1.

Примерный календарный план работы ученика на учебный год

Таблица 1.

Сроки	Характеристика деятельности	Ожидаемые результаты
Сентябрь	Обсуждение и корректировка темы, формулировка гипотезы, постановка цели и задач	Выбрана тема, составлено резюме проекта
Октябрь-ноябрь	Определение основных этапов работы, изучение научно-популярной литературы по теме работы, работа с биофизическими и иммунологическими терминами; выбор методов исследования	Написание реферата, конспекта по теме работы
Декабрь-февраль	Подготовка и проведение эксперимента	Приобретение навыков экспериментальной работы, получение проб жировых тканей мышей, регистрация данных, получение результатов
Март	Обсуждение полученных результатов учащимся по проекту с руководителем	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

Адаптивное ремоделирование жировых тканей – быстро развивающееся направление физиологии. Для подготовки материалов к проекту школьника, а также для проведения проспективного исследования необходимо было систематизировать новые литературные данные.

ГЛАВА 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМАТИКЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРОЕКТОВ

Жировые ткани в температурных и пищевых адаптациях человека и животных

Стремительное распространение висцерального ожирения среди населения экономически развитых стран, грозящее, по мнению экспертов ВОЗ, перерасти в неинфекционную пандемию XXI века, послужило толчком в последние два десятилетия к интенсивным исследованиям физиологии, биохимии и молекулярной биологии жировой ткани [4, 16, 21, 39, 41]. Полученные результаты продемонстрировали центральную роль «адипозного органа» в энергобалансе, а также его высокую клеточную гетерогенность и чувствительность разных популяций адипоцитов к внутри- и внешне средовым сигналам [8, 9, 26]. Продолжение исследований, выяснение механизмов адаптивных перестроек жировых тканей, их влияния на метаболический гомеостаз необходимо для разработки терапевтических подходов к коррекции абдоминального ожирения и метаболического синдрома [4].

2.1. Физиология жировых тканей

Жировая ткань – важнейший эффектор в системе энергообмена. Существует два вида жировой ткани – бурая и белая жировая ткань, различающиеся между собой анатомической локализацией, особенностями цитологии, биохимии, а также функционально. Бурая жировая ткань представляет собой компактные скопления из клеток с множеством мелких капель, в которых запасены липиды. Содержание триацилглицерола составляет примерно от 30% и обычно не превышает 50 – 55% [14]. Другая характерная черта бурых адипоцитов - очень высокое содержание митохондрий. Именно высокое содержание железосодержащих митохондриальных цитохромов придает этой ткани специфический бурый

цвет [14, 26, 36]. Ткань хорошо васкуляризована и иннервирована в основном симпатическими норадренергическим волокнами. Эти свойства указывают на высокую метаболическую и окислительную активность бурой жировой ткани. Особенно возрастает скорость потребления скоплениями бурого жира в ранние сроки постнатального онтогенеза, при пробуждении гибернантов от зимней спячки, при адаптации к низким температурам среды [10]. Особого внимания заслуживает анатомическая локализация скоплений бурого жира. Практически у всех млекопитающих имеется межлопаточное скопление, а у мелких млекопитающих оно самое крупное [42, 43]. Другие крупные скопления проходят вдоль позвоночных артерий, вдоль вен, возвращающих кровь от верхних конечностей в сердце, в области ворот почек, у некоторых животных около перикарда. 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, послужили основой для предположения о термогенной функции. Эксперименты с микросферами и органным распределением сердечного выброса подтвердили эту гипотезу [14]. Функция бурой жировой ткани состоит в генерации теплоты для температурного гомеостатирования [37]. Менее однозначна, противоречива, подвергается критике концепция об участии бурого жира в регуляции энергетического баланса [15, 27].

Белая жировая ткань представлена относительно диффузно локализованными скоплениями висцерального, в основном абдоминального жира, а также подкожным жировым депо [41]. Белая жировая ткань представляет главные запасы для животного, сохраняющиеся продолжительное время. Ее основная задача – снабжать субстратами в форме жирных кислот другие органы. До 85 % влажной массы белого жира занимает триацилглицерол [26]. Адипоциты белой жировой ткани гораздо крупнее, достигают 120 мкм в диаметре по сравнению с 30-50 мкм у бурого адипоцита. Белую жировую ткань часто называют депо так как она в

основном выполняет энергозапасующую функцию. Происхождение белых и бурых адипоцитов различно [28, 45]. Если первые происходят из боковой мезодермы, то вторые из миобластного происхождения – параксиальной мезодермы [45].

При некоторых воздействиях, прежде всего под действием холода в депо белого жира появляются буроподобные клетки, чаще всего называемые бежевыми адипоцитами [9, 26, 27, 32, 43]. Их природа не вполне понятна, современные исследования позволяют утверждать, что их происхождение не связано с типичным бурым жиром [28]. Некоторые исследователи показали, что белый адипоцит может трансформироваться в буроподобный бежевый адипоцит [45]. Бежевый адипоцит по сравнению с типичным бурым и белым имеет промежуточное содержание митохондрий. Трансформация из белого в бежевый обратима. Эти открытия привели к возникновению гипотезы о существовании двух типов адипоцитов: «классических», переходящихся из миобластов и трансформированных из белых адипоцитов [9, 26]. Полностью неизвестны механизмы и факторы, трансформирующие один тип клеток в другой [16, 32, 33].

2.2. Возрастные изменения бурой и белой жировых тканей.

Метаболический синдром

Скопления бурого жира закладываются еще в пренатальном онтогенезе [14]. Особенно высока интенсивность термогенеза у молодых животных. С возрастом интенсивность энергообмена в жировых тканях обоих типов снижается [14]. Показано, что в межлопаточном буром жире лабораторных мышей уменьшается содержание клеток, сведения о возрастной динамике разобщающего белка и интенсивности термогенеза неоднозначны [26]. Но в терминальный период онтогенеза у крыс и мышей отмечено усиление термогенеза [44]. Скопления белой жировой ткани закладываются примерно в те же сроки, что и бурый жир, но рост и развитие у грызунов пахового и абдоминального жира начинается после

рождения. В первый месяц жизни клетки пахового жира мультилокулярны, значительная часть их содержит разобщающий белок хоть и в значительно меньших количествах, чем адипоциты бурого жира [26]. По мере полового созревания оформляется самое крупное окологонадное скопление абдоминального жира. После полового созревания развивается усиленный липогенез, сопровождающийся слиянием липидных капель, чрезмерной гипертрофией адипоцитов. Предполагают, что уменьшение объема цитоплазмы, митохондрий постепенно приводит к гипоксии, что запускает апоптоз клеток, накопление в ткани фагоцитирующих их макрофагов хроническое вялотекущее воспаление [26].

Было обнаружено, что жировая ткань обоих видов секретирует многочисленные гормоны [34, 35]. Лептин — один из основных гормонов жировой ткани. Он играет ключевую роль в регуляции энергетического гомеостаза, сигнализируя головному мозгу о запасах жира в организме [] Адипоциты секретируют лептин в количествах, пропорциональных массе жировой ткани. Эффект лептина, регулирующий массу тела, обусловлен не только гипоталамическим (центральным) влиянием, но и периферическим путём, через ауто- и паракринные механизмы стимуляции липолиза в белой жировой ткани. Предполагается, что функция лептина в регуляции энергетического баланса направлена в большей степени на предотвращение снижения энергетических запасов в организме, чем их увеличения, таким образом, предотвращения развития ожирения [21].

Помимо депонирования энергии, жировая ткань через адипокины обладает способностью взаимодействовать с различными органами и системами, включая и ЦНС, и тем самым участвовать в регуляции разнообразных функций организма, а через взаимодействие с нейроэндокринной системой в адаптации организма к различным внешним воздействиям, таким как голод, стресс, переедание [34].

Изменение собственных свойств адипоцитов, соотношение адипоцитов разных типов в жировой ткани стареющего организма является

причиной возрастной дисфункции жировой ткани. Одним из последствий подобных изменений является развитие необратимой резистентности к инсулину в жировой ткани [24]. Возрастное снижение потребления энергетических субстратов клетками вызвано развивающейся в процессе онтогенеза резистентностью к инсулину и резистентностью к лептину.

В последующие годы многочисленные наблюдения и исследования подтвердили: избыточное накопление абдоминальной жировой ткани, как правило, сопровождается метаболическими нарушениями. Комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений, являющихся факторами риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, в основе которых лежит инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия, в литературе известен под названием метаболический синдром [4].

Неблагоприятные метаболические последствия, развивающиеся как при избытке, так и при недостатке жировой ткани, подтверждают важность ее секреторной активности для нормального функционирования организма. К настоящему времени накоплена обширная информация о связях между ожирением и такими заболеваниями как сахарный диабет, сердечнососудистые, онкологические и др. Избыточное развитие жировой ткани, особенно в висцеральной области, прямо коррелирует с инсулинорезистентностью, гипергликемией, дислипидемией, артериальной гипертензией, протромботическим и провоспалительным состояниями [21, 24, 41]. Распространенность ожирения и связанных с ним метаболических нарушений и заболеваний в последние годы достигли эпидемических размеров. Так, имеющиеся при ожирении гиперлептинемия и лептинорезистентность могут быть одним из ведущих факторов в развитии инсулинорезистентности. Сочетание периферической лептинорезистентности, повышенной концентрации в плазме СЖК, триглицеридов, ЛПНП и хиломикронов, развивающееся на фоне гиперкортизолемии, приводят при ожирении к развитию липотоксических

нарушений, конечным результатом которых являются проявления метаболического синдрома: инсулинорезистентность, гиперлипидемия, гипергликемия, повышение АД, кардиомиопатия [41, 46].

В условиях лептинорезистентности усиливается также влияние лептина на кальцификацию сосудов, аккумуляцию холестерина макрофагами, инициацию оксидативного стресса, повышение тонуса симпатической нервной системы. Все эти процессы в совокупности способствуют ускоренному развитию атеросклеротических изменений сосудов при ожирении [41]

В природных условиях, по-видимому, значительные колебания температурного фактора поддерживают высокую термогенную активность бурой жировой ткани, повышенную метаболическую активность белого жира. Имитация средовых воздействий, в том числе, адаптация к низкотемпературным экспозициям и калорийно ограниченным диетам рассматривается в качестве перспективного относительно безопасного средства сдерживания метаболического старения. В тоже время результаты их влияния на метаболические показатели и разные компартменты жировых тканей лабораторных животных недостаточно однозначны.

2.3. Влияние пищевой рестрикции, низких температур на жировые ткани животных.

Влияние низких температур на бурую жировую ткань детально изучалось, начиная с 60-х г. 20 в. Морфолого-анатомические наблюдения, определение дыхания ткани *in vitro* до и после холодового воздействия убедительно доказывали причастность бурого жира к холод-индуцированной теплопродукции [14]. Знаменитые эксперименты с микросферами по определению органного распределения сердечного выброса продемонстрировали очень высокую мощность теплообразования в буром жире. Ведущую роль бурого жира в качестве основного эффектора терморегуляции млекопитающих подтверждает динамика термогенных ответов, опережающая динамику в других потенциальных

терморегуляторных эффекторах. Для разных видов млекопитающих описаны значительные тканевые перестройки, многократное увеличение в ней клеток, содержания в них митохондрий и разобщающего белка при хронических холодовых воздействиях. О масштабах холоду-индуцированной клеточной пролиферации свидетельствует рост количества адипоцитов в 10-70 раз в первые несколько суток режима адаптации животных к холоду. Бурый жир крупных млекопитающих, включая человека, проявляет не меньшую реактивность при действии низких температур [15].

Небольшие сомнения относительно необходимости бурого жира для компенсации повышенных теплопотерь возникли с получением животных с нокаутом гена UCP1, которые способны адаптироваться к низким температурам. Однако эта адаптация сопряжена с более высокими значениями скорости потребления кислорода, т.е. локализация, принцип термогенеза в буром жире препятствуют случайным потерям тепла, организм в присутствии бурого жира функционирует экономнее. Несмотря на выраженные характерные изменения свойств бурого жира при холодовой адаптации, до настоящего времени ведутся дискуссии о его первостепенности в термогенных ответах на холод. Обсуждается роль разобщения Са насоса в качестве другого возможного механизма прибавочной теплоты которая возникает после адаптации к холоду [33].

С обнаружением значительных количеств бурого жира у человека и активация термогенеза в буром жире с помощью низкотемпературных воздействий рассматривается все чаще как наиболее безопасный физиологичный способ метаболической коррекции. [15] Однако, используемые в лабораторном эксперименте режимы адаптации к низким температурам, к сожалению, слишком экстремальны для человека. Как правило, холодовая адаптация представляет постоянное содержание животных в условиях низкой температуры. В связи с этим перспективными представляются в терапии метаболического синдрома и ожирения не

постоянно действующий холодовой фактор, а краткосрочные, но регулярные низкотемпературные экспозиции. Имеются две работы, в которых изучалось влияние краткосрочных холодových экспозиций на бурый и белый жир и метаболическое состояние предрасположенных к развитию метаболического синдрома мышей линии C57Bl6 [30, 31]. В обоих периодический холодовой фактор стимулировал термогенез, выраженность адаптивных изменений была неодинаковой, что, возможно, связано с линией, возрастом, в котором начинался эксперимент. Активация термогенеза в буром жире компенсировалась увеличением потребления корма, по крайней мере, в одной из работ [31]. В результате масса белых жировых депо у экспериментальных животных не отличалась от контрольных животных, показатели глюкозы, триглицеридов, СВЖК крови также не отличались, либо были даже повышенными [30, 31, 40]. Таким образом, холод-индуцированная активация термогенеза в буром жире недостаточна для коррекции метаболических показателей без учета потребления корма животными.

Начиная с 30-х г. 20 в. установлено на разных видах животных, что рано начатая 40% пищевая рестрикция (калорийно ограниченное питание) оказывает выраженное геропротекторное действие [6]. Механизмы увеличения продолжительности жизни окончательно не установлены, в последние годы предполагается, что немаловажную роль в этих механизмах играет воздействие пищевой рестрикции на обмен в жировых тканях [21]. Известно, что при полном голодании термогенез в буром жире ингибируется, развиваются дистрофические изменения [14, 26]. Влияние неполной пищевой рестрикции начали изучать относительно недавно, поэтому сведения относительно немногочисленны. Нет окончательной ясности в отношении угнетения термогенеза в буром жире экспериментальных животных [25]. Установлено, что 40% пищевая рестрикция не влияет на массу, содержание белка в буром жире [17]. Сведения о влиянии этого пищевого режима на содержание ДНК

неоднозначны. Установлено, что у экспериментальных крыс общее содержание ДНК в буром жире не отличается от опытной группы [29]. В ряде экспериментов у мышей отмечено увеличение содержания ДНК в межлопаточном скоплении при действии этого фактора даже в термонеutralных условиях [29]. Установлено, что в позднем онтогенезе пищевая рестрикция препятствует снижению содержания митохондрий и их окислительной активности в адипоцитах бурого жира [38]. В большинстве работ пищевая рестрикция вызывает редукцию белого жира. Степень этой редукции, связана ли она с уменьшением количества клеток в ткани или с уменьшением их размеров, не изучены. В тоже время изучение этих вопросов имеет первостепенное значение для прогноза метаболического состояния животных при выходе из экспериментального пищевого режима. Известно, что при таком метаболическом режиме работы в белом жире появляются бежевые адипоциты [9, 17, 29]. Действительно, в двух работах было установлено появление UCP1-содержащих адипоцитов как паховой так и в окологонадной жировой ткани [9]. Появление этих клеток оптимизирует обменные процессы в белых адипоцитах, способствует поддержанию относительно небольшого размера белых адипоцитов и повышенной окислительной активности. Является ли это временным явлением, или же постоянным, динамика состояния жировых тканей при пищевой рестрикции, а также вопросы, касающиеся биологической целесообразности появления потенциально термогенных клеток в абдоминальных депо практически не изучены [9].

Немногочисленные разрозненные данные по влиянию умеренных периодических холодовых воздействий, умеренной пищевой рестрикции на термогенез в жировых тканях, на энергообмен, углеводном и липидный обмен кроме того получены на различных линиях лабораторных мышей и крыс, с использованием разных (стандартная, высокожировая и др) диет. Это дополнительно вносит неоднозначность в получаемые результаты, создает сложности с их интерпретацией. Таким образом, из анализа

литературы следует необходимость проведения более глубокого и детального изучения комплексного воздействия данных факторов на одну линию лабораторных мышей. На первом этапе требуется проспективное исследование энергообмена жировых тканей, их термогенного потенциала в динамике ограниченной пищевой рестрикции и при раздельном и сочетанном действии пищевой рестрикции и сниженных температур.

ГЛАВА 3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для уточнения проблемы и адекватной в ней ориентировки были проведены ряд пробных экспериментов

3.1. Объекты и методы исследования

В качестве объекта использовались бурая, белая жировая ткань и плазма крови лабораторных мышей линии ICR. Эта аутбредная линия мышей разводится в Сибири в питомниках ГНЦ ВБ «Вектор» и в виварии ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). В наших экспериментах использовались мыши из ГНЦ ВБ «Вектор», характеризующиеся повышенной резистентностью к транспортировке, болезням дыхательных путей. На начало экспериментов возраст мышей всегда составлял 4-5 нед. Продолжительность экспериментов варьировала от 3-4 недель (это минимальный срок, требуемый для формирования функциональной системы адаптации к новому пищевому режиму и развертывания неспецифического адаптационного синдрома) до 8 недель. Животные содержались в виварии ФБГиХ. Во всех экспериментах мышей разделяли на группы. Контрольная группа содержалась постоянно при 23 ± 2 °C, со свободным доступом к воде и корму. В экспериментах с пищевой рестрикцией опытная группа, находившаяся постоянно при 23 ± 2 °C, получала корм в количестве на 40% меньше потребления контрольной группы. В экспериментах с холодовой адаптацией животные высаживались в период с 9.00 до 17.00 в холодильную камеру с температурой 5-7 °C. Эксперименты заканчивались умерщвлением животных с помощью декапитации. При выполнении манипуляций над лабораторными животными за основу брали правила Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным.

Бурую жировую ткань извлекали из межлопаточной области, а белую жировую ткань извлекали из окологонадной и ретроперитонеальной области, освобождали от фрагментов мышечной и соединительной ткани, затем взвешивалась общая масса кусочка жира, кусочка необходимого для приготовления гомогената и кусочка для определения дыхания жировой

ткани. Кусочки тканей гомогенизировали в 0,5 мл буфера Трис HCl 10 ммоль/л, ЭДТА 1 ммоль/л, рН = 7,2.

Для определения общего тканевого белка по методу Lowry тканевой гомогенат солубилизировали раствором 1,5% DСNa и 0,66 н NaOH, центрифугировали 15 минут при 2000 g, после соответствующей обработки пробы спектрофотометрировали при 750 нм. Содержание ДНК рассчитывали по результатам спектрофотометрии при 270 и 290 нм тканевого гидролизата. Гидролиз ДНК проводили в 0,5 М растворе HClO₄ после предварительной экстракции и удаления свободных нуклеотидов 0,2 М HClO₄, щелочного гидролиза и удаления рибонуклеотидов [22].

Интенсивность энергообмена тканей оценивали по скорости поглощения O₂ суспензией стандартно измельченных образцов при 37 °С с помощью биохимического анализатора «Эксперт-001-МТХ» (Россия) [29].

Анализ данных проводился с использованием программы «Статистика 6» фирмы StatSoft. Различия между средними значениями показателей оценивали с помощью непараметрического критерия U Манна-Уитни.

3.2. Предварительные результаты по теме проектов, предлагаемых школьникам

Целью первой серии предварительных исследований было выяснение характера и механизмов адаптивных изменений жировых тканей лабораторных аутбредных мышей ICR при ограниченной пищевой рестрикции.

Всего проведено два эксперимента: в декабре 2015 г. и в марте 2017 г. Контрольные группы 8-нед мышей имели практически одинаковые значения соматометрических показателей как в начале, так и в конце эксперимента, несмотря на выраженные различия в количестве потребляемого корма при свободном доступе к нему (табл. 2). Весной суточное потребление корма составило 5,5 г/мышь, зимой этот показатель

был почти в 2 раза больше и составлял 10 г/мышь. С повышенным потреблением корма в группе декабрьских мышей коррелировало повышенное среднее значение глюкозы в крови, взятой через 2 ч после удаления из клеток корма. При этом в декабре доля мышей в выборке с содержанием глюкозы 8-9ммоль/л была ниже, а доля животных с содержанием глюкозы выше 12 ммоль/л (гипергликемия) была повышенной по сравнению с весенней группой. Такие особенности животных в декабрьском эксперименте косвенно указывают на их пониженную чувствительность к лептину и, вероятно, инсулинорезистентность [24].

Средние показатели массы всех исследованных скоплений жировой ткани в контрольной группе в весеннем эксперименте были выше, чем зимой.

Таблица 2

Влияние 3-недельной 40%-пищевой рестрикции на соматометрические показатели и содержание глюкозы в крови мышей

Показатели	весна		Осень-зима	
	Контроль n=5	Опыт n=7	Контроль n=11	Опыт n=11
Масса тела, г	37,33±1,96	28,53±0,67*	35,91±0,48	34,42±1,21
Длина тела, см	10,78±0,22	10,06±0,17	10,38±0,05	10,41±0,13
ИМТ	0,33	0,28	0,33	0,32
Потребление корма животным, г/сут	5,5±0,52	3,3±0,40	10,04±0,49 ⁺	6,00±0,55 ⁺
Содержание глюкозы в крови, ммоль/л	8,50±2,04	8,43±0,80	9,79±1,15	10,68±0,83

Примечание: В этой и последующих таблицах статистическая значимость различий $p < 0,05$: * между контрольной и опытной группами; ⁺ между двумя сериями эксперимента

Таблица 3

Влияние 3-недельной 40% пищевой рестрикции на бурую и белую жировые ткани мышей

Показатели	март		декабрь	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Межлопаточная бурая жировая ткань				
масса, мг	125,50±12,61	108,29±12,26	86,91±5,19 ⁺	109,01±4,12
масса, %	0,34±0,07	0,38±0,05	0,24±0,02	0,319±0,013
ДНК, мкг/мг	0,69±0,27	0,67±0,14	0,58±0,07	0,45±0,09
ДНК, мкг	86,25±9,00	72,36±7,51	49,46±6,61 ⁺	66,81±7,26
Белок, мкг/мг	85,94±13,29	92,76±8,62	100,13±8,19	68,05±8,01
V _{O₂} , нмоль/мин•мг	1,03±0,15	1,52±0,36	1,38±0,17	0,93±0,12
Ретроперитонеальная белая жировая ткань				
масса, мг	287±60,72	76,75±1,64*	127,82±20,46	169,15±9,60
масса, %	0,78±0,21	0,27±0,10	0,38±0,05	0,49±0,03
Окологонадная белая жировая ткань				
масса, мг	622,33±73,65	324±48,07*	372,73±42,02	496,07±27,21
масса, %	1,64±0,17	1,13±0,20	1,03±0,11	1,44±0,066
ДНК, мкг/мг	-	-	0,17±0,04	0,22±0,02
ДНК, мкг	-	-	69,82±18,71	106,40±13,37
Белок, мкг/мг	19,63±6,18	20,65±4,50	32,64±5,92	32,11±7,04
V _{O₂} , нмоль/мин•мг	0,22±0,06	0,32±0,06	0,17±0,04	0,17±0,05

В буром жире существенных различий между контрольными группами по содержанию тканевого белка, ДНК, скорости потребления O₂ не наблюдалось (табл. 3). Следовательно, увеличение массы межлопаточного скопления носило характер гиперплазии. В окологонадном

жире средние показатели содержания тканевого белка (мкг/мг) были ниже чем в декабре, но эти различия не были статистически значимыми. Таким образом, состояние обменных процессов в жировых тканях контрольных животных в декабрьском и мартовском экспериментах согласуются с предположением о частичной инсулинорезистентности контрольных животных в декабрьском эксперименте [42].

В весеннем эксперименте в опытной группе масса тела, длина тела, индекс массы тела были ниже по сравнению с контрольной группой (табл. 2), т.е. пищевая рестрикция, как и ожидалось, привела к угнетению ростовых процессов, к угнетению энергозапасания в жировых депо. Содержание белка в окологонадном скоплении экспериментальных мышей не изменялось, скорость потребления O₂ увеличивалась на 50%, но различия между группами не были статистически значимыми (табл.3). Морфология, розоватый цвет окологонадной жировой ткани косвенно также указывает на увеличение содержания митохондриальных цитохромов и, вероятно, на повышенную окислительную активность клеток. В отличие от абдоминальной жировой ткани масса межлопаточного бурого жира, содержание в нем белка, ДНК не отличались в контроле и в опыте. Скорость потребления O₂ была выше в 1,5 раза, что, по-видимому, объяснимо большей теплопродукцией для компенсации повышенных теплопотерь, так как отношение площади поверхности к массе тела у более мелких экспериментальных животных было больше (табл. 3).

В декабрьском эксперименте пищевая рестрикция практически не влияла на показатели животных и показатели жировых тканей. Проявлялась даже тенденция к увеличению массы жировых тканей

Суточное потребление корма, соматометрические показатели были практически одинаковы в контрольной весенней группе и в опытной декабрьской группе животных (табл. 2). При их сопоставлении выраженность различий массы жировых тканей несколько стирается, но различия по глюкозе крови сохраняются.

Таким образом, рост, пищевое поведение, углеводный обмен животных, их реакция на пищевую рестрикцию зависят от еще каких-то пока неидентифицированных факторов. Поскольку эксперименты выполнены при естественном освещении в разные сезоны года, можно предположить влияние фотопериода на реакцию организма. Эффект пищевой рестрикции на рост и энергообмен жировых тканей был более выражен в весеннем эксперименте. Характер этого влияния сходен с результатами, ранее полученными в нашей лаборатории. При более продолжительной 8-нед 40% пищевой рестрикции также имело место угнетение роста абдоминальной жировой ткани и усиление скорости потребления O₂ как в окологонадном скоплении так и в межлопаточном буром жире [17]. Отмеченные закономерности при продолжительной пищевой рестрикции были более выражены, носили статистически значимый характер, также были получены в эксперименте, выполненном в весенние месяцы. Биологическая целесообразность обнаруженной резистентности массы жировых тканей к пищевой рестрикции в зимнем эксперименте, ее механизм требует дальнейших исследований.

Таблица 4.

Сочетанное влияние низкотемпературных экспозиций и ограниченного предоставления корма на соматометрические и метаболические показатели мышей

	Контроль	Холодовые экспозиции, потребление корма как в контроле	Контроль	Холодовые экспозиции, свободный доступ к корму	Холодовые экспозиции, 20% пищевая рестрикция
Масса тела	43,56±0,91	37,66±0,60	40,72±1,93	40,44±1,01	37,18±1,2
Длина тела	11,13±0,08	10,81±0,08	10,87±0,16	10,87±0,10	10,70±0,15

Потребление корма, г/сутки	6,1±0,58	3,75±0,24	10,43±0,58 ⁺	11,43±0,38 ⁺	7,70±0,53 ⁺
Глюкоза крови, ммоль/л	9,91±1,02	8,04±0,72	9,81±0,72	12,09±0,58	9,74±0,63

Таблица 5.

Сочетанное влияние низкотемпературных экспозиций и ограниченного предоставления корма на массу, пластический и энергетический обмен жировых тканей

	Контроль	Холодовые экспозиции, потребление корма как в контроле	Контроль	Холодовые экспозиции, свободный доступ к корму	Холодовые экспозиции, 20% пищевая рестрикция
Межлопаточная бурая жировая ткань					
Масса, мг	108,53±7,30	95,40±2,71	138,80±15,32	105,50±10,62	103,10±7,26
Масса, %	0,24±0,01	0,25±0,01	0,34±0,04 ⁺	0,25±0,02	0,27±0,02
ДНК, мкг/мг	0,58±0,14	0,61±0,07	1,14±0,13 ⁺	2,86±0,24	1,82±0,38
ДНК, мкг	58,50±12,23	58,52±7,49	142,61±23,30	264,07±22,23 [*]	183,62±35,55 [*]
Белок, мкг/мг	58,7±0,61	-	122,08±8,30 [*]	125,07±24,97	-
V _{O2} , нмоль/мин•мг	1,16±0,07	1,62±0,15	1,29±0,16	1,80±0,12	1,95±0,097
Ретроперитонеальная белая жировая ткань					
Масса, мг	197,60±20,62	76,67±12,30 [*]	178,60±14,93	200,60±29,42	102±10,5
Масса, %	0,41±0,03	0,20±0,03 [*]	0,44±0,05	0,48±0,06	0,27±0,03
Окологонадная белая жировая ткань					

Масса, мг	510,2±47,3	201,87±28,4 0*	502,8±62,84	567,50±66,28	451,38±54,98 +
Масса, %	1,15±0,09	0,52±0,06*	1,09±0,21	1,38±0,14	1,24±0,16 ⁺
ДНК, мкг/мг	0,21±0,04	0,39±0,08	0,18±0,04	0,09±0,02*	0,32±0,07
ДНК, мкг	107,0±13,3 3	84,76±8,56	71,54±17,99	54,22±15,22	117,65±17,68
Белок, мкг/мг	11,20±1,94	-	15,09±3,43	13,05±1,61	-
V _{O2} , нмоль/мин•мг	0,24±0,03	0,56±0,09*	0,32±0,08	0,16±0,03	0,27±0,05

3.3. Влияние курса регулярных холодových экспозиций на свойства жировых тканей и углеводный обмен животных

Контрольные группы животных в весеннем и осенне-зимнем эксперименте не отличались по соматометрическим показателям, но как и в экспериментах с пищевой рестрикцией суточное потребление корма в расчете на животное было существенно выше в осенне-зимнем эксперименте (табл. 4). Другой особенностью контрольных мышей в декабрьском эксперименте были повышенный рост межлопаточного бурого жира, двукратное превышение в нем показателей относительного и суммарного содержания ДНК, общего белка по сравнению с этими же показателями в весенней контрольной группе (табл.5).

В обоих проведенных экспериментах ежедневные холодových экспозиции в течение 8 нед не оказывали существенного влияния на соматометрические показатели (табл.4). Частота случаев гипергликемии не изменялась или даже увеличивалась в осенне-зимнем эксперименте. Масса

исследуемых скоплений жировой ткани не изменялась (табл. 5). Энергообмен и пластический обмен жировых тканей в условиях периодических холодовых воздействий изучался только в осенне-зимнем эксперименте (табл.5). Скорость потребления кислорода бурым жиром увеличивалась на 16%, хотя общий тканевой белок существенно не изменялся. Как и ожидалось, под действием холода в ткани увеличивалось и относительное и суммарное содержание ДНК, указывая на повышенную клеточную пролиферацию и обогащение межлопаточного скопления мелкими клетками. Масса окологонадного и ретроперитонеального скоплений белого жира, содержание в окологонадном скоплении белка, ДНК, скорость потребления кислорода не различались в контрольной и опытной группах. Отсутствие изменений в абдоминальной жировой ткани в сочетании с выраженным усилением энергообмена и пластического обмена в буром жире, лишний раз подтверждает, что белый жир в отличие от бурого не участвует в системной теплопродукции. Усиление теплопродукции в буром жире теоретически могло стимулировать липолиз в депо белого жира и поток жирных кислот из них в бурый жир. Поскольку этого не произошло, вероятно, повышенные в период холодовой экспозиции энергетические затраты компенсировались, например, за счет перехода к торпидности. Другим фактором, препятствующим ограничению роста жировых депо на холоде, может быть усиление пищевой мотивации и повышенное потребление корма при свободном доступе к нему. Действительно, по сравнению с контрольной группой мыши экспериментальной группы потребляли в сутки на % больше (табл.5).

3.4. Сочетанное влияние регулярных холодовых экспозиций и ограничения кормов на свойства жировых тканей и углеводный обмен животных

В весеннем эксперименте одной из групп животных, проходивших курс холодных экспозиций, предоставляли корм в количестве, съедаемом контрольной группой. В осенне-зимнем эксперименте, в котором, как было отмечено, контрольная группа потребляла почти в 2 раза больше чем контрольная весенняя группа, сначала использовалась такая же схема ограничения кормления в сочетании с холодными экспозициями. Поскольку такое воздействие не влияло на динамику соматометрических показателей животных в первые 2 нед эксперимента, количество предоставляемого экспериментальной группе корма ограничили количеством, выдаваемым весенней опытной группе.

В обоих экспериментах средние показатели массы тела в опытных группах были меньше, длина тела, содержание глюкозы в крови не изменялось по сравнению с контрольными группами (табл.3). В обоих экспериментах скорость потребления кислорода бурым жиром увеличивалась, однако адаптивные изменения (увеличение относительного и суммарного содержания ДНК) в нем развивались только в осенне-зимнем эксперименте. В обоих экспериментах в опытных группах наблюдалось значительное снижение массы ретроперитонеального депо (табл. 4).

В весеннем эксперименте масса окологонадного скопления испытывала более чем двукратное снижение (табл.4). Хотя при этом суммарное содержание ДНК уменьшалось на 21%, эти изменения не были статистически значимыми, относительное содержание ДНК увеличивалось более чем на 80%, но из-за значительной вариабельности это увеличение также не было статистически значимым. Существенно на 133% возросло потребление кислорода окологонадной жировой тканью. В осенне-зимнем эксперименте и относительное и полное содержание ДНК увеличивалось на 77 и 64% соответственно, тем не менее эти изменения не были статистически значимыми. Масса окологонадного скопления практически

не изменялась. Скорость потребления кислорода окологонадным скоплением не изменялась.

Таким образом, как и в экспериментах с 40% пищевой рестрикцией, направленность и величина реакции жировых тканей к холодovým экспозициям различалась в экспериментах, выполненных весной и осенью.

С учетом современного состояния исследований, а также с учетом результатов предварительных экспериментов, необходимости добавления данных для полноценного статистического анализа была разработана примерная тематика исследовательских проектов учащихся:

1. Анатомо-морфологические особенности жировых тканей при адаптации к периодическим низкотемпературным воздействиям

Предполагается сопоставить массу нескольких скоплений белого жира, таких как абдоминальные окологонадный и ретроперитонеальный жир, подкожный паховый жир и массу межлопаточного и околощитовидного скоплений бурого жира. Околощитовидное скопление представляет интерес не только в связи с термогенной, но и с эндокринной ролью. При оценке морфологии основное внимание будет уделено признакам браунинга в белой жировой ткани

2. Адаптивные изменения морфологии бурой и белой жировых тканей при умеренном ограничении питания

В связи с данными о расширении популяции UCP1 содержащих адипоцитов вне бурого жира при ограниченной пищевой рестрикции, будет оцениваться визуально с помощью расширенной цветовой шкалы цвет окологонадного, ретроперитонеального и пахового жира

3. Особенности пластического обмена подкожного и висцерального белого жира при адаптации к 40% пищевой рестрикции

Пластический обмен будет оцениваться по содержанию общего и митохондриального белка, нуклеиновым кислотам.

4. Влияние умеренной пищевой рестрикции и регулярных холодových экспозиций на энергообмен висцерального белого жира и межлопаточного бурого жира

Энергообмен жировых тканей будет оцениваться *in vitro* по скорости потребления кислорода. Показатели энергообмена будут сопоставлены с показателями массы жировых депо и массы животных.

5. Сезонные особенности содержания глюкозы в крови лабораторных мышей

Будет протестирована гипотеза об осенне-зимнем снижении чувствительности к инсулину. Кроме постпрандиального определения и определения глюкозы натощак, планируется нагрузочные тесты.

6. Энергообмен, двигательная активность лабораторных мышей в зависимости от степени пищевой рестрикции

Для оценки адаптивных изменений энергообмена будет сопоставляться в контрольной и опытной группах скорость потребления кислорода животным в утренние и вечерние часы. Оценка общей двигательной активности будет проводиться по суммарному количеству посещенных квадратов в тесте «открытое поле»

7. Рост, ориентировочно-исследовательская активность мышей в условиях умеренной пищевой рестрикции и регулярных холодовых экспозиций

Планируется сопоставление в контрольной и опытной группах динамики массы и длины тела. Ориентировочно-исследовательская активность будет оценена в тестах «Открытое поле» и «крестообразный лабиринт»

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МАТЕРИАЛОВ И ОСНОВНЫХ ЭТАПОВ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОЕКТА «» УЧАЩЕГОСЯ

В 2016-2017 учебном году в проведении представленных выше экспериментов приняла участие Ворошилова Александра ученица 10 «С» класса лицея № 1. Знакомство с учащейся состоялось в ходе интернатуры. Саша мечтает о карьере эндокринолога, в связи с чем ее заинтересовала проблема гормональной регуляции углеводного обмена, предполагаемого участия в ней адипокинов. Саша самостоятельно читает научно-популярную и даже учебную вузовскую литературу. В ходе занятий Саша продемонстрировала уровень знаний выше среднего, выходящий за рамки школьной учебной программы. Поэтому ей было предложено принять участие в исследовании, проходящем на тот момент в лаборатории. Календарное планирование ее работы на весь учебный год представлено в таблице 6.

Таблица 6.

Календарный план работы Ворошиловой А.В. ученицы 10 «С» класса лицея № 1 на учебный год

Сроки	Характеристика деятельности	Ожидаемые результаты
Сентябрь	Обсуждение и корректировка темы, формулировка гипотезы, постановка цели и задач	Выбрана тема, составлено резюме проекта
Октябрь	Определение основных этапов работы, изучение научно-популярной литературы по теме работы, работа с терминами; выбор методов исследования	Обсуждение литературы по теме проекта и составление плана эксперимента

Ноябрь- Декабрь- Февраль	Подготовка и проведение экспериментов: 1. Освоение методов, необходимых для проведения эксперимента 2. Уход за экспериментальными животными 3.определение количества глюкозы в плазме крови	Приобретение навыков экспериментальной работы, протоколирование данных, получение результатов
Март	Обсуждение полученных результатов учащимся по проекту с руководителем	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

К проекту были составлены пояснительная записка, подобран список литературы для чтения учащейся; составлена инструкция по спектрофотометрическому определению глюкозы в плазме крови.

В пояснительной записке кратко освещается проблема регуляции углеводного обмена и ее нарушений, особенно связанных с повреждением

инсулярного аппарата (сахарный диабет 1 типа) и чувствительности тканей к инсулину (инсулинорезистентность), роль в этих нарушениях патологических изменений в абдоминальном жировом депо. Рассмотрено влияние на содержание глюкозы в крови таких факторов как возраст, избыточное питание. Теоретически обоснована возможность сдерживания возрастного нарушения углеводного обмена с помощью умеренного ограничения питания и холодových воздействий. Сформулированы цель и задачи данного исследования, подобран список научно-популярной литературы для самостоятельной работы учащегося, выделены основные этапы эксперимента.

Пояснительная записка к научно-исследовательской работе учащегося «Влияние некоторых эндогенных и экзогенных факторов на содержание глюкозы в крови лабораторных мышей ICR»

Гомеостаз – универсальное свойство организма животных и человека. Особую значимость для нормального протекания обменных процессов имеет гомеостаз глюкозы важнейшего для наших клеток энергетического и пластического субстрата. При ее недостатке особенно страдают клетки мозга, эритроциты, скелетные мышцы. Повышенное содержание глюкозы не менее опасно, так как она легко вступает в побочные реакции с белками крови и сосудистой стенки. Основным механизмом поддержания гомеостаза глюкозы – система гормонов инсулин – глюкагон. При повышении концентрации глюкозы инсулин направляет ее избытки на депонирование в печень, мышцы, жировую ткань, где из них синтезируется гликоген и триглицериды. Недостаточная секреция инсулина или сниженная чувствительность клеток к инсулину (инсулинорезистентность) приводят к гипергликемии, постепенно перерастающей в тяжелое нарушения обмена веществ - сахарный диабет. Гипергликемия, вызванная резистентностью к инсулину, часто диагностируется в пожилом возрасте. В последние годы в разных человеческих популяциях отмечают относительно ранний старт и стабильный рост частоты повышенного содержания глюкозы крови.

Выяснение природы раннего снижения чувствительности к инсулину, разнообразных факторов, которые влияют на гомеостаз глюкозы, имеет поэтому не только фундаментальное, но и прикладное значение для медицины. В исследованиях метаболических нарушений аутбредные мыши ICR рассматриваются как перспективная лабораторная модель человека.

Целью работы - выяснение влияния некоторых эндогенных и экзогенных факторов на содержание глюкозы в крови лабораторных мышей линии ICR репродуктивного возраста.

Задачи:

Сопоставить содержание глюкозы в крови мышей разного возраста

Определить содержание глюкозы в крови мышей осенью и весной

Оценить влияние умеренной пищевой рестрикции и регулярных холодовых экспозиций на содержание глюкозы

Гипотеза:

Продолжительное 3-8-нед умеренное 40% ограничение питания, а также регулярные холодовые экспозиции могут уменьшить частоту случаев гипергликемии, а также приведет к снижению среднего уровня глюкозы у лабораторных мышей.

Основные этапы эксперимента :

1. Получение плазмы крови с помощью центрифугирования при 100g (3000 об/мин)

2. Энзиматическая обработка проб плазмы с получением продукта, поглощающего свет 540 нм, в реакции, где окислителем является глюкоза. Использован диагностический набор Vital Diagnostic (Санкт-Петербург)

3. Спектрофотометрия проб при 540 нм

Рекомендуемая для учащегося литература:

1. Башмакова В. Регуляцией термогенеза занимается не только нервная, но и иммунная система, статья // <http://elementy.ru/news/431716> / ст.

2. Бурый жир. Бурая жировая ткань // <http://exam-ans.ru/fizika/8621/index.html?page=60> / ст.
3. Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома// Ожирение и метаболизм. 2004. № 1. С.34-45.
4. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Бутрова С.А. Жировая ткань как эндокринный орган //Ожирение и метаболиз. 2006. №1. С.14-20.
5. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань человека // Успехи физиологических наук. 2002. Т. 33. С. 17-29.
6. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания.- Новосибирск: АРТА, 284 с
7. Стасевич К. Жир бурый, белый, бежевый // Наука и жизнь. 2014 № 11, С.20-25.

Инструкция к проведению эксперимента

1. Взять пронумерованные пробирки с кровью, поместить их в центрифугу друг напротив друга и в течении 15 минут центрифугировать при 3000 об/мин.
2. Достать пробирки и произвести забор при помощи пипетки прозрачной плазмы (0,01мл) и перелить в заранее подготовленные и пронумерованные эппендорфы, добавить буферно-ферментативный раствор (2 мл).
3. Взять дополнительный эппендорф для приготовления калибровочного раствора. В него прилить 2 мл буферно-ферментного раствора и 0,01 мл раствора с известным количеством глюкозы.
4. Пробы в эппендорфах инкубируются в течении 10 минут при комнатной температуре

5. Вращая регулировочную ручку на передней панели прибора, выставить длину волны 540 нм

6. Кювету наполнить буферно-ферментным раствором, поставить в кюветное отделение напротив окошка, закрыть кюветное отделение, нажать кнопку обнуления («0А»). Эта процедура позволяет вычесть из результата поглощение света раствором, на котором готовились пробы

7. Заменить буферно-ферментный раствор в кювете на опытную пробу 1. Зарегистрировать на экране (передняя панель) значение оптической плотности, занести его в рабочую тетрадь.

8. Повторить эти манипуляции с остальными опытными пробами и с калибровочной пробой

9. Расчет концентрации глюкозы (С)

$$C = A_{\text{оп}} / A_{\text{кал}} \times 10 [\text{ммоль/л}]$$

$A_{\text{оп}}$ - адсорбция опытной пробы

$A_{\text{кал}}$ - адсорбция калибровочной пробы

10 ммоль/л – концентрация глюкозы в калибраторе

Анализ работы школьницы

На протяжении всего эксперимента Саша проявляла большой интерес к работе лаборатории, кроме задач, поставленных перед нею в связи с выполнением проекта, ухаживала за экспериментальными животными. Девочка очень инициативна, самостоятельно освоила методику оценки общей двигательной и ориентировочно-исследовательской активности мышей в тесте «открытое поле», надеется продолжить исследовательскую работу в лаборатории в следующем учебном году.

Запланированный эксперимент выполнен ею полностью. Измерения на спектрофотометре освоила легко, провела несложный математический анализ полученных результатов. Девочка с удовольствием обсуждает как литературные, так и собственные данные, не боится дискутировать по ним

Проявила самостоятельность в подготовке доклада и презентации к нему. По итогам проекта на конференции «Молодежь и наука» ее работа получила 1 место. По просьбе школьницы обсужден примерный план работы на следующий год.

Таким образом, четкое планирование работы по проекту, составление инструкций к эксперименту позволило школьнице легко справиться с задачами.

Выводы

1. Холодовые воздействия в сочетании с умеренной пищевой рестрикцией рассматриваются в качестве перспективных терапевтических подходов к лечению висцерального ожирения и метаболического синдрома. Сведения о влиянии пищевой рестрикции и холодových экспозиций на энергообмен и пластический обмен жировых тканей разных типов немногочисленны, разрознены и неоднозначны
2. В предварительных исследованиях умеренная пищевая рестрикция не влияла на массу, пластический и энергетический обмен бурой жировой ткани. Динамика массы белой жировой ткани, энергообмена, содержания в ней ДНК и белка зависела от сезона
3. Курс регулярных холодových экспозиций стимулировал термогенез в буром жире несмотря на продолжительно умеренное ограничение питания. Окислительная активность висцерального жира повышалась; адаптивное увеличение функционального термогенного резерва развивалось только в осенне-зимнем эксперименте.
4. С учетом результатов предварительных исследований составлены темы исследовательских работ для школьников: «Анатомо-морфологические особенности жировых тканей при адаптации к периодическим низкотемпературным воздействиям»; «Адаптивные изменения морфологии бурой и белой жировых тканей при умеренном ограничении питания»; «Особенности пластического обмена подкожного и висцерального белого жира при адаптации к 40% пищевой рестрикции»; «Влияние умеренной пищевой рестрикции и регулярных холодových экспозиций на энергообмен висцерального белого жира и межлопаточного бурого жира»; «Сезонные особенности содержания глюкозы в крови лабораторных мышей » ; «Энергообмен,

двигательная активность лабораторных мышей в зависимости от степени пищевой рестрикции»; «Рост, ориентировочно-исследовательская активность мышей в условиях умеренной пищевой рестрикции и регулярных холодových экспозиций».

Проект «Влияние некоторых эндогенных и экзогенных факторов на содержание глюкозы в крови лабораторных мышей ICR» успешно апробирован учащейся 10 «С» лица № 1 класса Ворошиловой А.

Список литературы

1. Ачекулова Л.И., Прохорчук.Н., Учебное проектирование по биологии в школе. Лабораторный практикум для студентов биологических специальностей педагогических вузов. Красноярск: Краснояр. гос. пед. Ун-т им В.П. Астафьева . 2007. 76 с.
2. Башмакова В. Регуляцией термогенеза занимается не только нервная, но и иммунная система // <http://elementy.ru/news/431716/> / ст.
3. Бурый жир. Бурая жировая ткань // <http://examans.ru/fizika/8621/index.html?page=60> / ст.
4. Бутрова С.А., Дзгоева Ф.Х., Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома// Ожирение и метаболизм.2004. № 1 . С. 34-45.
5. Вединеева Н.А. Развитие научно-исследовательской деятельности учителя и учащегося в школьной практике // Оренбург, 2004. №3. С.6-7.
6. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция //Успехи биологической химии. 2009. С. 341-388 .
7. Выготский Л.С. Проблема обучения и творческого развития в школьном возрасте // Избран, психол. исследования. М., 1982. Т.1. С.24
8. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Бутрова С.А. Жировая ткань как эндокринный орган // Ожирение и метаболизм. 2006. №1. С. 14-20.
9. 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.
10. Иванов Д.О. Нарушение теплового баланса у новорожденных детей. – Спб.: Наука, 2012 г.

11. Концепция развития исследовательской и инновационной деятельности в российских вузах // <http://cnp.miptic.ru/index.html> / Инновационный Центр МФТИ, Долгопрудный, 2009-2011.
12. Леонтович. А.В. Учебно-исследовательская деятельность школьника как модель педагогической технологии // Народное образование. 1999. № 10.
13. Мазяркина Т.В., Первак С.В Исследовательская деятельность школьников// Современные наукоемкие технологии..2011. №1.121 с.
14. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань. Молекулярно-клеточные основы регулируемого термогенеза. Красноярск: Изд-во Амальгама. 2002.528с.
15. Медведев Л.Н., Елсукова Е.И. Бурая жировая ткань человека // Успехи физиологических наук. 2002. Т. 33. С. 17-29.
16. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания.- Новосибирск: АРТА, 284 с.
17. Мизонова, О. В.,Елсукова Е.И., Медведев Л.Н., Энергообмен и биохимические особенности жировых тканей мышц линии ICR в условиях продолжительного ограничения питания. // Бюл. exper. биол. и мед. - 2013.№ 6. С.706-709.
18. Савенков А.И. Исследовательское обучение и проектирование в современном образовании // Школьные технологии. М.,2004. №4. С. 83-84.
19. Савенков А.И Содержание и организация исследовательского обучения школьников. – М.,2003. С.10-15.
20. Стасевич К. Жир белый, бурый, бежевый // Наука и жизнь. 2014. №11. С. 87-92.

21. Терешина Е.В. Возрастная дисфункция жировой ткани // Геронтология и гериатрия. 2010 . № 5.С. 98-101.
22. 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.
23. Федеральный государственный образовательный стандарт. Основное общее образование. // <http://standart.edu.ru> / Сайт Министерства образования и науки РФ.
24. Шварцбурд П.М. Разные лица инсулинорезистентности // Химия и жизнь. 2013. №7. С. 24-26.
25. Abreu-Viera, G. Adrenergically-stimulated blood flow in brown adipose tissue is not dependent on thermogenesis // American Journal of physiology. 2015. Vol. 3. doi: 10.1152/ajpendo.00494.2014
26. Cinti, S. The adipose organ at a glance. // Disease Models Mechanisms. 2012. Vol. 5. - P. 588-594.
27. Chabowska-Kita, A. Low ambient temperature during early postnatal development fails to cause a permanent induction of brown adipocytes // The FASEB Journal. 2015. P.489-510.
28. De Long, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2015. Vol. 308. P.E1085-E1105.
29. Elsukova, E.I. Physiological features of perigonadal adipose tissue containing uncoupling protein UCP1 in ICR mice // Bull. Exp. Bio. Med. 2016. Vol. 161. P. 347-350.
30. Flachs, P. Induction of lipogenesis in white fat during cold exposure in mice: link to lean phenotype // International Journal of obesity. 2016. DOI 10.1038/ijo.2016.228.

31. Hyung, sun Yoo, Liping Qiao, Chris Bosco, Lok-Hei Leong , Nikki Lytle, Gen-Sheng Feng, Nai-Wen Chi, Jianhua Shao Intermittent Cold Exposure Enhances Fat Accumulation in Mice // Plos One. 2014. Vol.9. e96432
32. Kalinovich A., DeLong, B., Cannon J. Nedergaard UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning // Biochimie. – 2017. Vol.11. P. 1-13.
33. Keipert, S. Brite/beige fat and UCP1 – is it thermogenesis? // Biochim. Biophys. Acta. 2014.Vol. 1837. P. 1075-1082.
34. Kim S. Moustaid-Moussa N. Secretary, Endocrine and Autocrine/Paracrine Function of the Adipocyte // J. Nutrition 2000.130.3110S-3115S
35. Lihn A., Pedersen S.,Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity // Obes. Rev. 2005.6.P. 13-22.
36. Nedergaard, J. The browning of white adipose tissue: some burning issues // Cell Metab.2014. Vol. 20. P. 396-407.
37. Oelkrug R. Goetze N., Exner C., Lee Y. Brown fat in a protoendothermic mammal fuels eutherian evolution // Nat. Commun.2013. Vol. 4. doi: 10.1038/ncomms3140
38. Perrot-Sinal T.S. Plasma testosterone levels are related to various aspects of locomotor activity in wild-caught male meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) // Physiol. Behav. 1998. Vol. 64. P. 31-36.
39. Rajala M., Scherer E. The Adipocyte - at the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation. and Atherosclerosis // Endocrinology 2003. 144.doi: 3765-3773.
40. Ravussin Y., Xiao C., Gavrilova O., Reitman M. Effect of intermittent cold exposure on brown fat activation, obesity, and energy homeostasis in mice // Plos One. 2014. Vol. 9: e112495. doi: 10.1371
41. Rosen, E.D., What we talk about when we talk about fat? // Cell .2014 Vol. 156. P. 20-44.
42. 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. Comp. Physiol. B.* 2006. Vol. 6. P.240-249.

43. Wang, Y. The great roundleaf bat (*Hipposideros armiger*) as a good model for cold-induced browning of intra-abdominal white adipose tissue // *Plos One.* 2014. Vol. 9: e112495. doi: 10.1371/journal.pone.0112495.

44. Wickler S.J., Horwitz B.A., Flaim S.F. Thermogenic capacity and brown fat in rats exercise-trained by running // *Metabolism.* 1998. P.76-83.

45. Wu, J. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown // *Genes Dev.* 2013. Vol. 27. P. 234-250.

46. Yu Y.-H., Ginsberg H. Adipocyte Signaling and Lipid Homeostasis: Sequelae of Insulin-Resistant Adipose Tissue // *Circ. Res.* 2005. doi: 1042-1052.