

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ В.А Кратасюк  
подпись инициалы, фамилия  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_ 20\_\_ г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология  
06.06.01.07 Биофизика

ВЛИЯНИЕ ГРЕЧНЕВОЙ КРУПЫ НА СИРТУИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ  
У ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Руководитель

\_\_\_\_\_

PhD Ш. Панде

подпись, дата

Выпускник ББ15-01Б №041509947

\_\_\_\_\_

М.В. Рязанова

подпись, дата

Красноярск 2019

## **РЕФЕРАТ**

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние гречневой крупы на сиртуиновую активность у подопытных животных» содержит 42 страницы текстового документа, 53 использованных источников.

**СИРТУИН, ГРЕЧНЕВАЯ КРУПА, ОГРАНИЧЕНИЕ КАЛОРИЙ, ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, КРЫСЫ, МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА.**

Цель работы: оценить влияние диеты с повышенным содержанием клетчатки (за счёт добавления гречневой крупы) на содержание сиртуина в разных тканях экспериментальных животных.

Эксперименты на животных проводились с применением всех необходимых мер для минимизации боли и дискомфорта в соответствии со стандартными руководящими принципами, установленными в отношении ухода и использования животных для экспериментов, и с должным одобрением Комитета по этике животных. Исследование проводили на базе Сибирского Федерального Университета, кафедры биофизики и лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН.

В результате исследования, выдвинуто предположение, что диета (Группы 3 и 2) вызывает снижение общего содержания белка в печени, почках и желудке экспериментальных животных после 6-ти недель кормления. Метаболизация сиртуина происходит, главным образом, в печени, а наименьшее количество сиртуина содержит сыворотка крови. Так же можно сказать, что гречневая крупа, действительно, стимулирует выработку сиртуина у подопытных, крыс и поэтому ее можно использовать для корректировки диеты.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	8
1.1 НАД-Зависимые деацетилазы.....	8
1.2 Транскрипционное регулирование сиртуинов у дрожжей.....	9
1.3 Метаболизм сиртуина млекопитающих .....	11
1.4 Влияние ограничения калорий на продолжительность жизни .....	13
1.5 Связь сиртуина и ограничение калорий .....	14
1.6 Активатор сиртуина: Ресвератрол.....	16
1.7 Пищевые волокна: растворимые и нерастворимые .....	17
1.8 Антиоксидантные свойства диетических волокон .....	19
1.9 Связь микробиоты кишечника и пищевых волокон .....	21
1.10 Гречневая крупа: перспективное пищевое волокно .....	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	24
2.1 Материалы .....	24
2.1.1 Экспериментальные животные.....	24
2.1.2 Экспериментальная диета .....	24
2.1.3 Реагенты .....	25
2.2 Методы.....	25
2.2.1 Процедура вскрытия.....	25
2.2.2 Иммуноферментный анализ (ELISA) .....	27
2.2.3 Определение содержания общего белка методом Lowry .....	28
2.2.4 Статистическая обработка .....	29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ .....	30

3.1 Анализ динамики веса.....	30
3.2 Содержание общего белка (метод LOWRY) в тканях.....	30
3.3 Содержания сиртуина в тканях (иммуноферментный анализ).....	32
3.4 Содержание сиртуина: сравнение групп .....	33
3.5 Процентное содержание сиртуина относительно общего белка .....	34
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>36</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>37</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>38</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Существует связь между потреблением питательных веществ и биомаркерами, в связи с различными факторами, влияющих на их чувствительность и специфичность. Для того, чтобы исследовать влияние питательных веществ на молекулярный уровень и разработать чувствительный биомаркер прибегают к протеомике, предметом изучения которой являются белки. Одним из наиболее перспективных биомаркеров является сиртуин [1].

Сиртуины, являются консервативными белками NAD<sup>+</sup>- зависимыми деацетилазами и, следовательно, их функция неразрывно связана с клеточным метаболизмом. За последние два десятилетия накопления доказательств показало, что сиртуины являются не только важными датчиками энергетического статуса, но и защищают клетки от метаболических стрессов, а также влияют на глюконеогенез, гликолиз и чувствительность к инсулину. Универсальные функции сиртуинов, в том числе, поддерживаются их разнообразным расположением клеток, позволяя клеткам ощущать изменения энергетических уровней в ядре, цитоплазме и митохондрии [2].

Сиртуины найдены во всех организмах, от бактерий до эукариот. Они подразделяются на 5 разных классов, но существует также деление и внутри классов. В геноме дрожжей, например, закодировано пять сиртуинов, а в геноме человека – семь. SIRT1,2,6,7 млекопитающих находятся в ядре, SIRT1,2 – в цитоплазме, SIRT3,4,5 – в митохондриях. В своем исследовании мы заострили свое внимание на сиртуине первого класса.

Сиртуины первого класса деацетилируют и ингибируют ядерный рецептор, который активирует синтез жира и адипогенез в организме, что приводит к потере жира и благоприятным изменениям клеточного строения. Эти ферменты опосредуют внутриклеточный ответ, который способствует выживанию клеток, восстанавливает поврежденные ДНК, тем самым увеличивая долговечность клеток. Активация сиртуинов приносит широкий спектр других преимуществ для здоровья, а уровень его активности указывает на состояние

питания, а также на прогрессирование заболевания при раке, воспалении, ожирении, сердечно-сосудистых заболеваниях и вирусных инфекциях [3].

Обычно сиртуины находятся в неактивном состоянии, но при активации гена белка SIR1, запускается процесс выживания, который продлевает жизнь клеток и всего организма в целом. Ограничение калорийности регулирует уровень белка сиртуина млекопитающих в различных тканях и органах, где он действует как на гистоновые, так и на негистоновые субстраты. Активность гена SIR1 можно увеличить с помощью некоторых пищевых продуктов с высоким содержанием клетчатки, одним из которых, по нашему мнению, является гречневая крупа [4].

Гречневая крупа выращивается в России в больших масштабах и является одной из важнейших альтернативных культур и ценным сырьем для производства функциональных продуктов питания. Это богатый источник крахмала, важных белков, почти сравнимых с животными белками, поскольку содержит все незаменимые аминокислоты. Таким образом, пищевая ценность гречихи (как источника белка) выше, чем у других злаков, в которых всегда не хватает одной или двух аминокислот, помимо этого высокая пищевая ценность поддерживается за счет высокого содержания лизина. Рутин и кверцетин являются основными антиоксидантами гречихи и используются для лечения хронической венозной недостаточности. Основная пищевая ценность гречневой крупы аналогична зерновой, однако гречневая крупа не содержит глютена и поэтому называется псевдозерновой. Но из-за своего локального распространения неизвестно собственно, как она влияет на выработку сиртуина, и, соответственно, на продолжительность жизни [5].

В связи с этим целью нашего исследования является оценить влияние диеты с повышенным содержанием клетчатки (за счёт добавления гречневой крупы) на содержание сиртуина в разных тканях экспериментальных животных.

Исходя из цели были поставлены следующие задачи:

- 1) провести кормление групп экспериментальных животных рационом с повышенным содержанием клетчатки (за счет добавления гречневой крупы);
- 2) проанализировать динамику веса животных в зависимости от диеты;
- 3) определить уровень общего белка в тканях животных;
- 4) определить уровень сиртуина в разных тканях крыс;

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 НАД-Зависимые деацетилазы

Сиртуины- семейство эволюционно консервативных НАД- зависимых белков, обладающих деацетилазной или АДФ-рибозилтрансферазной активностью. Свое название семейство получило в честь одного из представителей – дрожжевого белка Sir2 (анг. Silent Information Regulator 2 proteins) [6].

Сиртуин был впервые идентифицирован как белок, необходимый для поддержания типа спаривания у дрожжей *S. cerevisiae* белок, который ингибитирует транскрипцию генов, определяющих тип спаривания. Экспрессия Sir2 приводила к снижению уровня ацетилирования гистонов [7] и увеличению продолжительности жизни дрожжей [5], нематод *Caenorhabditis elegans* [6] и других многоклеточных животных [7]. Белки Sir2 высококонсервативны у всех организмов (от архебактерий до эукариот). У *S. cerevisiae* помимо Sir2p были найдены четыре сиртуина (Hst1–4), тогда как у млекопитающих идентифицированы семь гомологов SIRT1–7. Они выполняют множество функций.

Некоторые выполняют каноническую функцию модификации гистонов и регулирования транскрипции. Другие нацелены на белки в цитоплазме и митохондриях и участвуют в регулировании широкого спектра процессов, таких как обмен веществ и нейродегенерация. А также специализируются на удалении ацетильных групп, в то время как другие удаляют большие модификации, такие как присоединенные липиды, или создают новые модификации. Дальнейшее изучение этих молекул выявило связь активности белков со старением во многих организмах [8].

Было определено, что NAD<sup>+</sup>-зависимая деацетилирующая активность имеет место для SIRT1-3 и более слабо для SIRT5-7. Разнообразие сиртуинов у человека сопровождалась отделением органелл. В частности, SIRT3, SIRT4 и

SIRT5 предпочтительно располагаются в отсеке митохондрий, тогда как SIRT1, SIRT6 и SIRT7 являются преимущественно ядерными. SIRT2 обычно находится в цитоплазматическом отделении [9].

Среди семи членов семейства ядерный SIRT1 – ближайший гомолог дрожжевого Sir2 [10]. К настоящему времени он лучше всего охарактеризован. Его субстратами являются не только гистоны. SIRT1 участвует в регуляции транскрипции и играет важную роль в регуляции апоптоза и выживания клеток, в эндокринных сигнальных механизмах, в дифференциации, метаболизме и укладке хроматина. Принимает участие в обеспечении чувствительности к инсулину, снижение которой считается основным фактором в развитии диабета второго типа. Результаты последних исследований показали, что в клетках и тканях, устойчивых к инсулину, экспрессия SIRT1 подавлена, а ингибирование SIRT1 приводит к развитию инсулиновой устойчивости [11].

## **1.2 Транскрипционное регулирование сиртуинов у дрожжей**

Активность гена сиртуина, по мнению ученых, связана со старением и продолжительностью жизни организмов, обычно используемых в качестве моделей биологии старения человека – дрожжей, червей-нematод и плодовых мушек. Участие сиртуина в регуляции питательных веществ и связь его активности с центральным метаболитом, NAD +, дали намеки на то, что сиртуины могут повысить продолжительность жизни [12].

Как мы говорили выше, сиртуины работают в клетках великого множества эукариот – от одноклеточных организмов до млекопитающих. Около 10 лет назад Дэвид Синклер (David Sinclair) и его коллеги из Массачусетского технологического института обнаружили, что гиперэкспрессия сиртуина, который кодируется геном Sir2, замедляет старение дрожжевых клеток. Точнее, они обнаружили, что его избыток увеличивает число делений, которые клетки могут претерпевать в течение своей жизни [13]. Дальнейшие исследования показали, что этот фермент не только меняет плотность гистонной упаковки и

тем регулирует активность генов, но и участвует в ремонте повреждений ДНК [14].

Авторы статьи «Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH» проводили свои эксперименты на дрожжах, в которых содержится (Sir2). Они высказали мысль о том, что ограничение калорий увеличивает репликативную продолжительность жизни у дрожжей, активируя Sir 2, увеличивая доступный пул NAD для Sir2, высоко консервативную NAD-зависимую деацетилазу. Было также показано, что ограничение калорий задерживает начало или уменьшает частоту многих, связанных с возрастом заболеваний, включая рак и диабет [15].

Чтобы изучить механизм, с помощью которого о расширяет продолжительность жизни, Su-Ju Lin, Ethan Ford1 и другие создали модель в почках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В этой системе продолжительность жизни может быть увеличена за счет ограничения содержания глюкозы в среде от 2% до 0,5% или путем снижения активности чувствительной к глюкозе, cAMP-зависимой киназы [16].

В дрожжах дополнительная копия гена SIR2 продлевает репликативную продолжительность жизни на 50%, в то время как удаление Sir2 сокращает продолжительность жизни. Sir2 замораживает хроматин, обеспечивает восстановление ДНК и участвует в прочности хромосомы во время мейоза. Sir2 способствует долговечности путем подавления образования ядовитых внекромосомных рядов рДНК у дрожжей [17].

### **1.3 Метаболизм сиртуина млекопитающих**

Как уже было выяснено ранее (в работах Синклера), избыток сиртуина увеличивает число делений дрожжей, а также меняет плотность гистонной упаковки и тем самым регулирует активность генов, участвует в ремонте повреждений ДНК. Однако ученые долгое время не знали, действуют ли сиртуины в таком же качестве и в клетках высших эукариот, прежде всего млекопитающих [13].

Теперь на этот вопрос найдет ответ, причем положительный. Он содержится в статье того же Синклера (он сейчас занимает кафедру в Гарвардском университете), его коллеги Филиппа Обердорффера [Philipp Oberdoerffer] и их соавторов, которая 28 ноября появится в журнале Cell. Они изучили, как зависит здоровье клеток мышей от активности гена SIRT1. Этот ген у млекопитающих отвечает за производство фермента, аналогичного дрожжевому белку, который кодирует ген Sir2 [18].

Оказалось, что функции обоих ферментов очень схожи друг с другом. Это и позволяет утверждать (или, как минимум, предполагать), что сиртуины задействованы в очень древнем механизме клеточного старения, который биологическая эволюция изобрела свыше миллиарда лет назад [19].

В основе этого механизма лежит постепенное ослабление способности сиртуинов одновременно выполнять обе свои главные функции. Как уже говорилось, эти ферменты уплотняют гистонные каркасы нуклеосом и тем самым предотвращают включение тех генов, продукты которых в данный момент клетке не нужны или даже вредны. Однако сиртуины в то же время помогают устранять поломки ДНК, вызванные ультрафиолетовым излучением или свободными радикалами. При появлении таких дефектов молекулы этих белков срочно мигрируют из мест первоначального расположения в горячие точки. Такая миграция на время ослабляет сиртуиновый контроль за гистонными структурами и потому увеличивает вероятность нештатного включения различных генов [20].

Как показали эксперименты исследователей группы Синклера, степень этой вероятности зависит от возраста. У молодых животных поломки ДНК возникают не так уж часто, поэтому сиртуины-ремонтники обычно успевают вовремя вернуться к месту службы. Однако с возрастом клетки начинают производить больше свободных радикалов (в основном, из-за прогрессирующей усталости органов внутриклеточного дыхания, митохондрий). Из-за этого сиртуины покидают места постоянной дислокации чаще и на более длительное время, а потому хуже следят за плотностью гистонов. Последствия понятны: клетки пожилых особей начинают все чаще страдать от активации ненужных генов. Такое разбалансирование генного аппарата как раз и приводит к старению организма [21].

Стоит напомнить, что активность гена SIRT1 можно увеличить с помощью некоторых пищевых продуктов и специальных препаратов. Например, исследователи Национального института по проблемам старения США, работающие под руководством доктора Рафаэля ди Кабо (Rafael de Cabo), проанализировали эффекты активирующей сиртуин 1 малой молекулы, известной как SIRT1720, на состояние здоровья и продолжительность жизни мышей. Животных начиная с 6-месячного возраста и до конца жизни содержали на стандартном рационе, обогащенном SIRT1720 в концентрации 100 мг/кг [22].

Полученные при этом наблюдения показали, что употребление SIRT1720 увеличило среднюю продолжительность жизни мышей на 8,8%. Более того, содержащиеся на обогащенном этим соединением корме животные имели меньшую массу тела и меньшее относительное содержание жира в организме. При этом в течение всей жизни они демонстрировали лучшее функционирование мышечной ткани и лучшую координацию движений по сравнению с мышами группы контроля [23].

Дополнительные исследования, посвященные изучению влияния SIRT1720 на различные показатели состояния метаболизма, продемонстрировали, что экспериментальный препарат снижал содержание в крови общего холестерина, а также липопroteинов низкой плотности, что

потенциально защищает от развития заболеваний сердечно-сосудистой системы. Он также оказывал положительное влияние на чувствительность тканей к инсулину, что может предотвращать развитие сахарного диабета. Более того, SIRT1720 обладал противовоспалительным действием, проявляющимся в различных тканях организма. Это является исключительно важным фактором, так как считается, что хронические слабо выраженные воспалительные процессы способствуют старению и развитию возрастных болезней.

По словам авторов, им удалось продемонстрировать, что искусственный активатор сиртуина 1 увеличивает продолжительность жизни и улучшает состояние здоровья животных, употребляющих в пищу стандартный корм. Это доказывает возможность разработки препаратов, которые позволят облегчить груз метаболических и других хронических заболеваний, ассоциированных со старением [24].

#### **1.4 Влияние ограничения калорий на продолжительность жизни**

Почти сто лет назад нобелевский лауреат Фрэнсис Пейтон Роус сообщил, что хроническое ограничение калорий вызывает полезные метаболические эффекты на спонтанное возникновение опухолей у крыс [25]. В то же время Osborne [26] показал, что ограничение калорий у молодых крыс (1,5–6 месяцев) восстанавливает fertильность в более позднем возрасте и продлевает продолжительность жизни [25]. Хотя первоначально эти результаты широко игнорировались, все большее число исследований, проведенных в последующие десятилетия, подтвердили эти преимущества ограничения калорий, и накопленные доказательства продемонстрировали, что ограничение калорий также защищает от других возрастных заболеваний, таких как хроническая почечная недостаточность.

В 1960 году Берг и Симмс предположили, что снижение жира в организме играет решающую роль в опосредовании положительного влияния ограничения

калорий на фертильность, возрастные патологии и продолжительность жизни у крыс [27].

Последующие исследования, однако, предположили, что преимущества ограничения калорий могут быть связаны с уменьшением абсолютного количества потребляемых калорий [28]. Совсем недавно эта концепция была оспорена, и данные указывают на влияние конкретных аминокислот при определении влияния долгосрочного ограничения калорий на продолжительность жизни и фертильность. В последние два десятилетия новые методы позволили сосредоточиться также на молекулярных основах метаболических преимуществ за счет ограничения калорий. Было выявлено несколько механизмов, которые, как было показано, играют определенную роль, таких как ослабление окислительного повреждения, снижение уровней инсулина и глюкозы, нарушение оси инсулиноподобного фактора роста I и гормона роста, а также активация семейства деацетилаз сиртуинов [29].

Параллельно с работой по ограничению калорий генетический скрининг долгоживущих мутантов *Saccharomyces cerevisiae* привел к открытию, что ген молчащей информации-регуляции-2 (Sir2) может замедлять старение у этого вида [30]. Позднее Sir2 был идентифицирован как NAD<sup>+</sup>-зависимая деацетилаза для белков гистонов, которая необходима для ограничения калорий для увеличения продолжительности жизни дрожжей [31].

## 1.5 Связь сиртуина и ограничение калорий

В целом ряде исследований была установлена связь между сиртуинами и ограничением питания. Низкокалорийное питание увеличивает продолжительность жизни многих организмов, включая некоторых млекопитающих, это происходит за счет активации синтеза сиртуинов.

Старение организма начинается с одной клетки на молекулярном уровне. Он включает изменения, связанные с укорочением теломер, клеточным

старением и эпигенетическими модификациями. Эти процессы накапливаются на протяжении всей жизни [32].

Хорошо известно, что ограничение калорий может замедлять процессы старения и отдалить начало развития многочисленных возрастных заболеваний. Отметим, что на некоторых животных моделях действие ресвератрола приводит к тем же положительным эффектам, что и ограничение потребляемых калорий. Иными словами, молекулярные механизмы действия ресвератрола аналогичны механизмам, стимулируемым в случае снижения количества потребляемых калорий. Недавно было высказано предположение, что SIRT1 может быть общим медиатором, играющим роль в обоих случаях [33].

Открыт механизм, объясняющий, почему низкокалорийная диета увеличивает продолжительность жизни: при ограничении поступающей в клетку энергии в митохондриях активируются сиртуины – белки, замедляющие старение, и повышается синтез молекул NAD<sup>+</sup>, необходимых в большинстве клеточных процессов. Ученые из медицинской школы Гарварда, медицинского колледжа университета Корнелла и национального института здравоохранения США обнаружили, что в тот момент, когда клетка подвергается стрессу, связанному с ограничением калорий, определенные гены оптимизируют функционирование организма в целях выживания, тем самым противодействуя старению [34].

Ограничение калорийности ограничивает потребление калорий и задерживает старение, от дрожжей до млекопитающих. При ограничении калорий у млекопитающих снижается масса тела, снижается уровень инсулина в крови и повышается чувствительность к инсулину. Во время ограничения калорийности, чтобы получить как можно больше энергии из ограниченных питательных ресурсов, происходит метаболический сдвиг организма к окислительному метаболизму с сопутствующей резистентностью к окислительному стрессу через усиленный митохондриальный биогенез. Происходит активация SIR1 и он функционирует для сохранения энергии организма путем увеличение окисления жирных кислот. Сверхэкспрессия мозга

SIRT1 достаточна для того, чтобы способствовать долголетию у мышей. Однако избыточная экспрессия SIRT1 еще не продемонстрировала увеличение продолжительности жизни у людей. У мышей повышающая регуляция SIRT1 защищает от стеатоза печени и гипергликемии, вызванных диетой с высоким содержанием жиров. Напротив, в ответ на кормление с высоким содержанием жира делеция SIRT1 приводит к стеатозу печени и воспалению [35].

## **1.6 Активатор сиртуина: Ресвератрол**

Ресвератрол является основным природным полифенольным соединением, которое содержится в некоторых фруктах и овощах, таких как виноград, арахис. Недавно он привлек внимание диетологов, химиков-медиков и медицинских работников благодаря своим многочисленным преимуществам в борьбе против старения, противоопухолевых, противовоспалительных, противовиабетических и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Ресвератрол играет эффективную роль в борьбе с несколькими путями, такими как окислительный стресс, апоптоз, дисфункция митохондрий и ангиогенез. Кроме того, он оказывает кардиозащиту путем ингибирования агрегации тромбоцитов [36].

Аналогичным образом, ресвератрол является мощным поглотителем свободных радикалов. Высокая эффективность ресвератрола может быть обусловлена тремя гидроксильными группами в его структуре. Таким образом, использование ресвератрола в качестве биологически активной добавки для здоровья быстро растет на современном рынке.

Ресвератрол предлагает широкий спектр профилактических и терапевтических альтернатив против различных заболеваний, включая различные виды рака [37].

## **1.7 Пищевые волокна: растворимые и нерастворимые**

Пища – это первостепенная потребность нашего организма. Тип, качество и происхождение пищи формируют полноценную работу нашего желудочно-кишечного тракта. Пищевые волокна - это вещества растительного происхождения, которые являются структурной частью растения и содержатся в фруктах, зернах, бобовых и овощах. Большинство пищевых волокон - полисахариды - это крахмалы. Крахмал представляет собой длинную цепь молекул глюкозы, связанных вместе альфа-связями. Волокна представляют собой длинную цепь молекул глюкозы, связанных вместе бета-связями. Человеческому организму не хватает ферментов для разрушения бета-связей, поэтому пищевые волокна не перевариваются и не абсорбируются. Непереваренные волокна переходит в толстую кишку, где кишечные бактерии могут их ферментировать [38].

Важность пищевых волокон нельзя недооценивать. Преабсортивные механизмы, связанные с насыщением, особенно те, которые находятся на уровне тонкой кишки, необходимы для индукции и поддержания сытости. Поэтому продление кишечной фазы обработки и абсорбции питательных веществ, вероятно, усиливает сытость, обеспечивая помощь в контроле за потреблением пищи [39]. Пищевые волокна имеют много функций, одной из которых может быть помощь в контроле за потреблением энергии и снижением риска развития ожирения. Это связано с их уникальными физическими и химическими свойствами. По тому как быстро пищевые волокна растворяются в воде, их можно классифицировать на растворимые и нерастворимые.

Растворимые пищевые волокна (к ним относятся пектин, часть гемицеллюлозы, камеди, слизи) начинают активно впитывать воду, в момент, когда они попали в организм, тем самым увеличиваясь в объеме, превращаются в густую субстанцию, похожую на клейстер. При набухании, растворимые волокна увеличивают растяжение желудка, вызывая афферентные блуждающие сигналы его наполненности, следовательно, обеспечивают длительное чувство

насыщения в послеобеденный период. Также они уменьшают общую абсорбцию жира и белка. Так как их присутствие в желудочно-кишечном тракте ограничивает физический контакт между питательными веществами и кишечными ворсинками, необходимыми для абсорбции [40].

Растворимые волокна повышают вязкость водной среды и приводят к замедлению всасывания глюкозы в кровь, предупреждая развитие некоторых болезней, таких как сахарный диабет. Диеты с более высоким содержанием растворимых волокон могут непосредственно уменьшить потребление усваиваемой энергии, таким образом, могут способствовать долгосрочному управлению весом. Кроме того, продукты с высоким содержанием пищевых волокон часто требуют больше времени для жевания.

Помимо этого, растворимые волокна смягчают стул; за счет того, что они впитывают воду, набухают, увеличивая объем каловых масс. Это обеспечивает лучшее продвижение их по кишечнику. Продукты, которые содержат растворимые пищевые волокна: овощи, мякоть фруктов, овсяные отруби, некоторые ягоды, бобовые (фасоль, горох, чечевица), льняное семя.

Нерастворимые волокна (целлюлоза, лигнин, часть гемицеллюлозы) действуют как губка в кишечнике, поглощая воду, но при этом не теряя своей формы. Они увеличивают объем фекалий и выведение желчных кислот, уменьшая время прохождения по кишечнику, и тем самым предотвращают запоры и карциномы толстой кишки. Активируют перистальтику, стимулируют моторно-эвакуаторной функции кишечника.

Способность нерастворимых волокон связываться с несколькими токсичными химическими веществами, включая канцерогены и мутагены, позволяет устранять эти вредные вещества через фекалии, оказывая детоксицирующее действие [41]. Нерастворимые пищевые волокна более распространены в пищевых продуктах по сравнению с растворимыми. Большинство пищевых продуктов, содержащих волокна, обычно содержат примерно треть растворимого и две трети нерастворимого волокна.

Нерастворимые и растворимые волокна присутствуют в разной концентрации в различных пищевых продуктах и имеют разные свойства; поэтому важно включать разнообразные продукты, содержащие волокна, в ежедневный план питания. Помимо полезных физиологических эффектов, таких как снижение холестерина, контроль диабета и улучшение пищеварительной системы, пищевые волокна также улучшают рост и активность полезных бактерий в пищеварительном тракте человека, действуя как пища для полезной микрофлоры кишечника человека [42].

## **1.8 Антиоксидантные свойства диетических волокон**

Недостаток в рационе пищевых волокон, содержащих, в частности, антиоксиданты, способствуют аллергическим, онкологическим и другим заболеваниям. Природные антиоксиданты регулируют влияние свободно-радикального окисления на основные биохимические процессы, протекающие в клетке. Они создают оптимальные условия для метаболизма и обеспечивают нормальный рост клеток и тканей.

Пищевые волокна являются полезным источником биоактивных полифенолов, витаминов, каротиноидов и токоферолов, которые могут обеспечивать дополнительную пользу для здоровья благодаря своей антиоксидантной активности.

Флавоноиды это группа полифенольных соединений, повсеместно встречающихся в продуктах растительного происхождения. Непосредственная роль флавоноидов в уменьшении окислительного повреждения. Защитные эффекты флавоноидов могут быть обусловлены улучшением антиоксидантного статуса. Оксидательный стресс характеризуется дисбалансом между образованием активных форм кислорода и антиоксидантной защитой. Повышенные уровни активных форм были вовлечены в этиологию и прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний, воспаления и диабета [43].

По-видимому, окислительный стресс вызывает клеточные повреждения, которое приводит к дисфункции эндотелия и прогрессирующему ухудшению здоровья сосудов. Эпидемиологические данные связывают более высокое потребление антиоксидантов в рационе питания с более низким уровнем сердечно-сосудистых заболеваний, в то время как увеличение антиоксидантной способности сыворотки связано с усилением гликемического контроля, снижением уровня крови, давления и улучшением липидного профиля крови [44].

Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что фенольные значения, будучи нуклеофильными, могут ингибировать перекисное окисление липидов благодаря своей способности очищать свободные радикалы и предотвращать повреждение свободных радикалов. Этот защитный эффект полифенольных антиоксидантов подтверждается данными, которые показывают, что некоторые компоненты пищевого происхождения могут предотвращать окислительное повреждение и апоптоз клеток, передавая электроны нестабильным свободнорадикальным молекулам, тем самым нейтрализуя их вредную активность. Краткосрочные интервенционные исследования, в которых изучалось влияние отдельных флавоноидов или продуктов, богатых флавоноидами, на биомаркеры циркулирующего окислительного стресса *in vivo*, были противоречивыми, причем некоторые из них не показали эффекта, тогда как другие демонстрируют некоторые преимущества. Таким образом, регулярное потребление пищевых волокон может обеспечить вас ценными источниками антиоксидантов в дополнение к их уникальному вкладу клетчатки и белка в рацион человека [45].

## **1.9 Связь микробиоты кишечника и пищевых волокон**

Микробиота кишечника приносит пользу хозяину разными способами: защищая систему защиты кишечного барьера, выделяя энергию и питательные вещества из рациона, и способствуя нормальной функции иммунной системы. И наоборот, дисбактериоз (дисбаланс кишечных бактерий) может иметь много отрицательных последствий для метаболизма и иммунитета. Дисбиоз может быть результатом многих факторов, таких как использование антибиотиков широкого спектра действия или, например, несбалансированного питания. Это может привести к изменениям целостности слизистой оболочки и бактериальной транслокации - миграции бактерий в районы за пределами кишечного тракта [46].

Клетки слизистой оболочки в кишечнике образуют барьер, который обычно непроницаем для жидкости, тем самым отделяя грамотрицательные бактерии от иммунных клеток хозяина. В случаях, когда слизистый барьер скомпрометирован, грамотрицательные бактерии могут транслоцироваться в различные области вне кишечника, включая, например, брыжеечные лимфатические узлы. Когда иммунные клетки активируются при контакте с грамотрицательными бактериями, могут индуцироваться воспалительные пути; например, брыжеечные лимфатические узлы могут начать продуцировать провоспалительные цитокины [47].

Микробиота кишечника и диета являются двумя важными компонентами для поддержания нормальной работы кишечника. Пищевые волокна могут механически стимулировать эпителий для выделения слизи. Измененная микробиота кишечника, возникающая из-за диеты с низким содержанием пищевых волокон, приводит к серьезным нарушениям выработки слизи и может повысить восприимчивость к инфекциям и развитию хронических воспалительных заболеваний [48].

## **1.10 Гречневая крупа: перспективное пищевое волокно**

Крупа гречневая выращивается в России в самых больших масштабах и является одной из важнейших альтернативных культур и ценным сырьем для производства функциональных продуктов питания. Многие нутрицевтические соединения существуют в семенах гречихи (в основном потребляемых человеком) и других тканях. Это богатый источник крахмала, важных белков, почти сравнимых с животными белками, поскольку он содержит все незаменимые аминокислоты [49].

Таким образом, пищевая ценность гречихи (как источника белка) более сложна, чем у других злаков, в которых всегда не хватает одной или двух аминокислот. Антиоксидант (флавоноиды и флавоны, фитостеролы, фагопирины), микроэлементы, в основном селен и большое количество пищевых волокон. Гречка имеет большой потенциал в качестве пищевого ингредиента, особенно для пищевой промышленности. Гречневая крупа имеет огромный потенциал для превращения в функциональную пищу, но ее еще предстоит начать как индустрию. Рутин и кверцетин являются основными антиоксидантами гречихи и используются для лечения хронической венозной недостаточности [50].

Основная пищевая ценность гречневой крупы (осущенных семян) аналогична зерновой, однако гречневая крупа не содержит глютена и поэтому называется псевдозерновой. Гречиха также содержит высокий уровень полиненасыщенных незаменимых жирных кислот, таких как линолевая кислота. Несколько витаминов (В1, С и Е) присутствуют, в то время как минералы присутствуют в изобилии. По сравнению с зерновыми, белок гречихи имеет высокое питательное качество благодаря относительно высокому уровню лизина. Скрещивание гречихи началось рано в России, но позже было развито также в Японии, Канаде и в некоторых других странах. Много разведения гречихи было сделано и в Китае, но это было главным образом улучшение и развитие отечественных сортов [51].

Некоторая селекция гречихи, в результате которой были получены широко известные сорта гречихи, проводилась также во Франции, Австрии, Чехии, Словении и в некоторых других странах. В мире наиболее известны банки генов гречихи в России (Санкт-Петербург), Китае (Пекин), Чехии (Прага) и Словении (Любляна) [52].

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Материалы**

#### **2.1.1 Экспериментальные животные**

Для своих исследований мы использовали самцов крыс линии Wistar (90-100 грамм) из Вивария Сибирского федерального университета в г. Красноярске. Крыс держали в индивидуальных пластмассовых клетках, раз в неделю клетки очищали и заменяли наполнитель. Помимо этого, раз в неделю проводилось плановое взвешивание крыс для контроля веса.

Животные имели свободный доступ к воде и находились в 12-часовом цикле освещения помещения (свет включался в 8 утра) при температуре приблизительно  $22 \pm 2$  градуса. Кормление проводилось на протяжении 6-ти недель.

#### **2.1.2 Экспериментальная диета**

Подопытные животные были случайным образом разделены на три группы по 8 особей в каждой. Для каждой из групп была подготовлена диета:

1) контрольная группа: крыс в этой группе, получавшей обычную диету, использовали в качестве контроля и кормили стандартной гранулированной пищей (пелетты), следя за тем, чтобы ежедневно оставалось (2-3 грамма);

\* Пелетты – специализированный корм для грызунов, который был приобретен в городе Красноярск по адресу Коммунальная 2а;

2) группа 1 – диета с ограничением калорий (крысы получали на 30% меньше гранул, чем контрольная группа);

3) группа 2 – диета с добавлением гречневой крупы;

При приготовлении рациона для второй группы использовалась гречневая крупа, которую покупали на рынке, а затем измельчали в специализированной

ручной мельнице на базе ТЭИ, смешивая с измельченными гранулами в соотношении (70% к 30%).

Пищевая ценность стандартных гранул (пеллеты) оценивалась путем расчета профиля питания (белки, жиры, углеводы) как указано. Был оценен примерный состав гречихи [53] в экспериментальной диете.

Весь корм хранился при 4 °С, порции выдавались в определенное время каждый день, и потребление пищи определяли, как сухую отбракованную пищу, вычтеннную из сухой представленной пищи.

Каждый день (утром), крысам давали 15 грамм корма, соответствующего расписанным диетам. При этом каждую неделю увеличивали количество корма на 3 грамма, в связи с повышенными потребностями крыс из-за их роста.

### **2.1.3 Реагенты**

Набор иммуноферментного анализа для оценки активности Sirtuin 1 (номер в каталоге SEE912Ra) был получен от Cloud-Clone Corp. (Хьюстон, США). Гидрофосфат динатрия, дигидрофосфат натрия и хлорид натрия были приобретены в Medigen, Новосибирск, Россия.

Набор для анализа общего белка был приобретен в Bio-Rad (Калифорния, США).

## **2.2 Методы**

### **2.2.1 Процедура вскрытия**

Эксперименты на животных проводились с применением всех необходимых мер для минимизации боли и дискомфорта в соответствии со стандартными руководящими принципами, установленными в отношении ухода и использования животных для экспериментов, и с должным одобрением Комитета по этике животных. Исследование проводили на базе Сибирского Федерального Университета, кафедры биофизики и лаборатории молекулярно-

клеточной физиологии и патологии ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН.

Нами был составлен план предстоящего эксперимента по определению связи между потреблением разного типа питания на количество и метаболизм сиртуина.

За сутки до вскрытия крысам не давали пищу (чтобы желудок был пуст), но продолжали давать воду. В день вскрытия крысам внутрибрюшно вводили хлоралгидрат (400 мг / кг массы тела), примерно через 10 минут крыса погружалась в сон и затем происходило скрытие. Кровь собирали пункцией сердца и оставляли на 4 час при 4 ° С с последующим центрифугированием при 1000 g в течение 10 минут при 4 ° С с использованием настольной центрифуги Eppendorf (5430R, Fisher Scientific, США). Сыворотку отделяли и хранили при - 80 ° С (Sanyo, Ultra-low freezer, Japan) до дальнейшего использования.

Также для анализа были взяты печень, желудок и почки, которые были вырезаны, промыты в изотоническом растворе, взвешены, после чего из них была вырезана свежая порция весом в 1 грамм и оставлена в морозильной камере при температуре 70 ° С до гомогенизации.

Позже предварительно взвешенные свежие порции тканей помещали в раствор фосфатного буфера (рН 7,0-7,2), гомогенизированного с помощью ультразвука (Bandelin, Berlin, Germany), тогда как образцы хранили во льду.

Гомогенат фильтровали с использованием фильтровальной бумаги Whatmann №. 1 с последующим центрифугированием при 5000 g в течение 5 минут при 4 ° С с использованием настольной центрифуги Eppendorf (5430R, Fisher Scientific, США).

Супернатант тщательно собирали для определения активности сиртуина 1 с использованием набора для иммуноферментного анализа. Оценка белка в экстракте ткани проводилась с использованием стандартного анализа Фолина-Лоури.

Коэффициент эффективности корма (КЭК) рассчитывали, как отношение прироста массы тела к общему потреблению пищи (конечный вес - начальный

вес / общее количество потребленной пищи), а коэффициент преобразования корма (КПК) определяли, как отношение количества потребленного корма к приросту веса.

## 2.2.2 Иммуноферментный анализ (ELISA)

В основе иммуноферментного анализа лежит иммунная реакция взаимодействия антигена с антителом. Для выявления образовавшихся иммунных комплексов (антigen-антитело) используется фермент, которым предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). В лунки планшета с антителами вносят биологический материал, содержащий антиген.

Последний избирательно связывается с фиксированными специфическими антителами. Затем несорбированные белки отмывают специальным раствором и в лунки добавляют конъюгат, содержащий специфичные к данному антигену антитела иной видоспецифичности и фермент. После добавления в данную систему хромогенного субстрата (ортофенилендиамина) последний расщепляется ферментом конъюгата, в результате чего изменяется цвет раствора в лунке.

Интенсивность окрашивания пробы исследуемого материала прямо пропорциональна содержанию в ней искомого антигена (цитокина). Учет интенсивности реакции опытных и контрольных проб проводят на специальных спектрофотометрах при длине волны 540 нм. Для исследования использовались:

- 1) Microplate reader with 450 +/- 10nm filter;
- 2) Многоканальные пипетки высокой точности с одноразовыми наконечниками (Gilson Pipetman Neo P200N, 20-200 мкл (Кат. № F144565);
- 3) Микроцентрифужные пробирки с низкой задерживающей крышкой (Thermo Scientific);
- 4) Дистиллированная вода;
- 5) Фильтр бумага (Whatmann №. 1);

- 6) Container for Wash Solution;
- 7) 0.01 mol/L фосфатный буфер Ph7.0-7.2;

Для проведения анализа доведите образцы до комнатной температуры. В первую очередь готовится стандарт за 15 минут до анализа. Концентрация стандарта в исходном растворе составляет 100 нг / мл. Подготовьте 7 пробирок, содержащих стандартный разбавитель 0,5 мл, и произведите серию двойного разбавления в соответствии с изображением, показанным ниже. Тщательно перемешайте каждую пробирку до следующей передачи. Настройте 7 точек разведенного стандарта, например, 100 нг / мл, 50 нг / мл, 25 нг / мл, 12,5 нг / мл, 6,25 нг / мл, 3,12 нг / мл, 1,56 нг / мл, а последняя пробирка EP со стандартным разбавителем заготовку - 0 нг / мл.

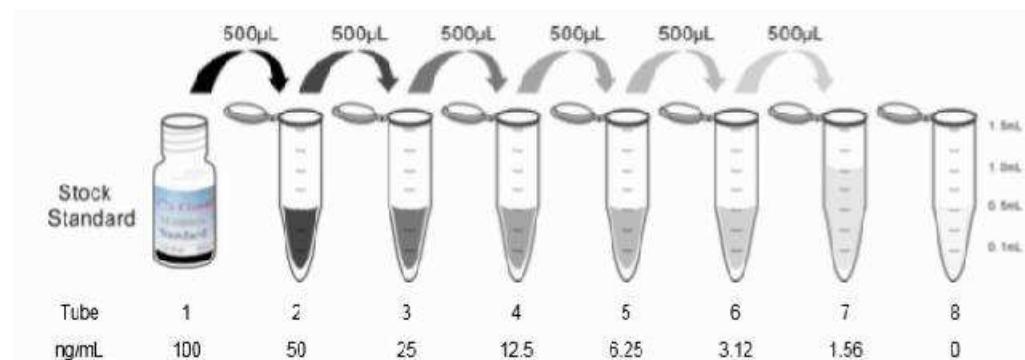


Рисунок 1 – Разбавление стандарта [http://www.cloud-clone.com/manual/ELISA-Kit-for-Sirtuin-2-(SIRT2)-SEA430Ra.pdf]

Реагенты (Detection Reagent A and Detection Reagent B) разбавить до рабочей концентрации в 100 раз с помощью анализирующего разбавителя А и В соответственно. Wash Solution разбавляют 20 мл дистиллированной водой для приготовления 600 мл промывочного раствора.

### **2.2.3 Определение содержания общего белка методом Lowry**

Метод количественного определения белка, основанный на измерении концентрации окрашенных продуктов, образующихся в результате сочетания двух химических реакций: биуретовой реакции на пептидную связь и

взаимодействия реактива Фолина — Чокалтеу с ароматическими аминокислотами.

Реагенты: реагент А и реагент В. Для определения оптической плотности образцов используем хроматограф при длине волны 750 нм.

Оборудование: пробирки; кюветы, спектрофотометр.

#### **2.2.4 Статистическая обработка**

Для определения значимости различий между средними был проведен односторонний дисперсионный анализ (1way ANOVA) с использованием теста Тьюки. Зависимости считали статистически значимыми на уровне значимости  $p < 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1 Анализ динамики веса

Взвешивание крыс в течении трех недель эксперимента не показало достоверных различий между группами (рис.1). Начиная с четвертой недели различия в весе выявлены между первой и второй группами крыс. Взвешивание на 4 неделе показало разницу в весе между первой, второй и третье группами. Во второй группе крыс рацион питания был снижен на 30%, что и вызвало потерю в весе.

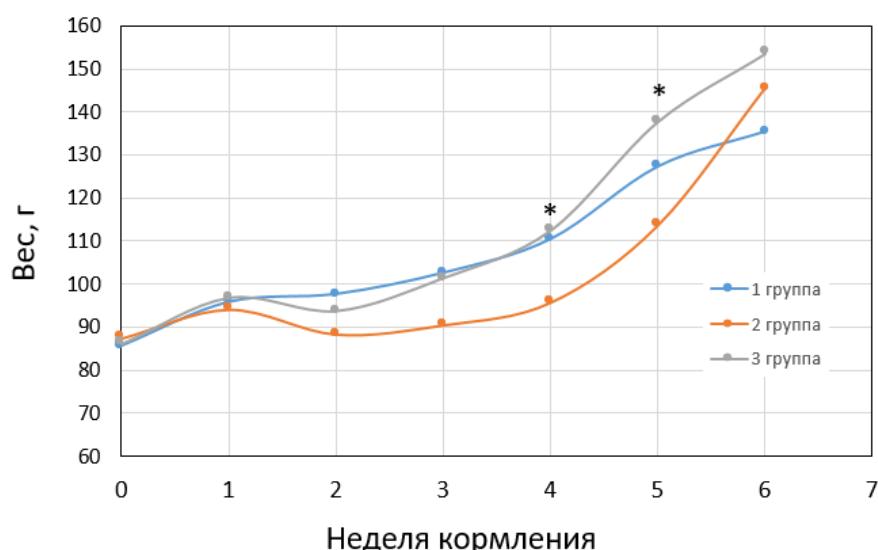


Рисунок 2 - Изменение веса крыс во время эксперимента

### 3.2 Содержание общего белка (метод LOWRY) в тканях

Метод количественного определения общего белка в тканях подопытных крыс основан на измерении концентрации окрашенных продуктов, образующихся в результате сочетания двух химических реакций: биуретовой реакции на пептидную связь и взаимодействия реагента Фолина — Чокалтеу с ароматическими аминокислотами. Результаты представлены в виде графиков:

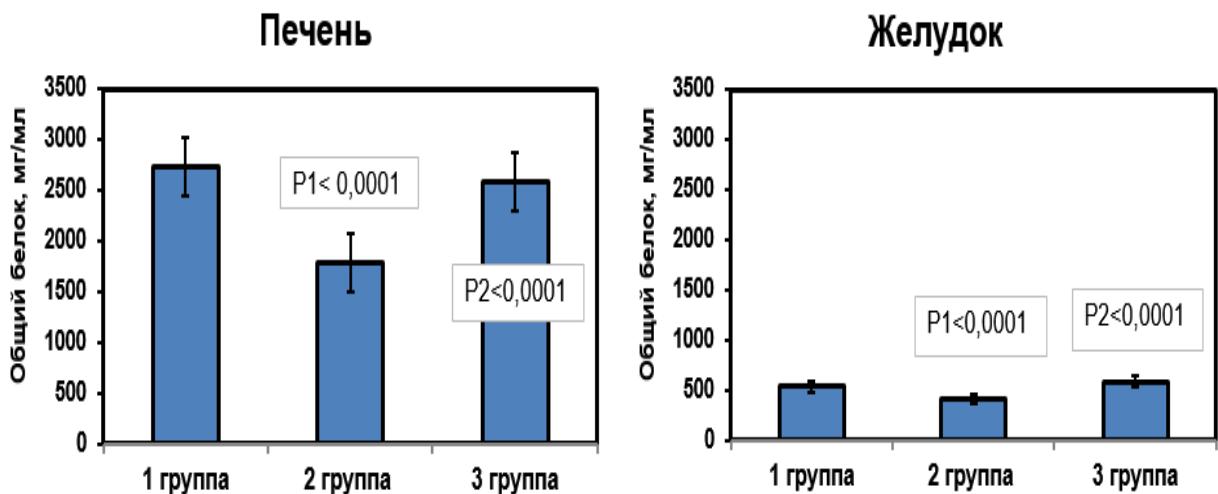


Рисунок 3 – Содержание общего белка в печени и желудке

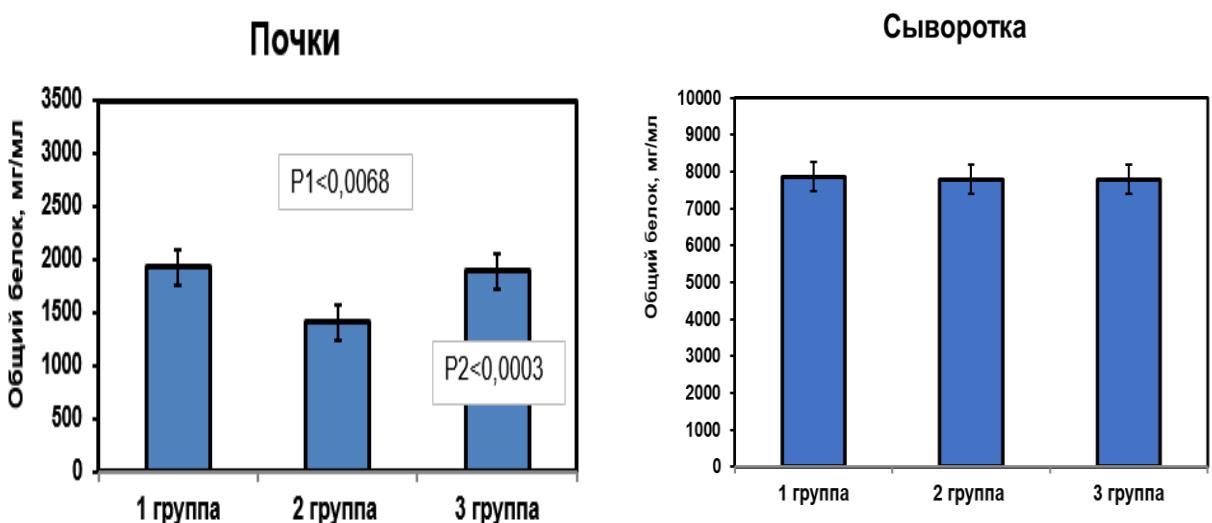


Рисунок 4 – Содержание общего белка в почках и сыворотке

На рисунках 3,4 представлено содержание общего белка в разных органах крыс, таких как печень, желудок, почки и сыворотка, в разных группах. По данным следует то, что общий белок в большем количестве содержится в сыворотке, вне зависимости от группы. Во второй группе содержание общего белка меньше, чем в остальных.

### 3.3 Содержания сиртуина в тканях (иммуноферментный анализ)

В основе иммуноферментного анализа лежит иммунная реакция взаимодействия антигена с антителом. Для выявления образовавшихся комплексов используется фермент, которым предварительно метится узнающий компонент (антиген или антитело). В лунки планшета с антителами вносят биологический материал, содержащий антиген.

Несорбированные белки отмывают специальным раствором и в лунки добавляют коньюгат, содержащий специфичные к данному антигену антитела иной видоспецифичности и фермент. После добавления в данную систему хромогенного субстрата (ортоФенилендиамина) последний расщепляется ферментом коньюгата, в результате чего изменяется цвет раствора в лунке.

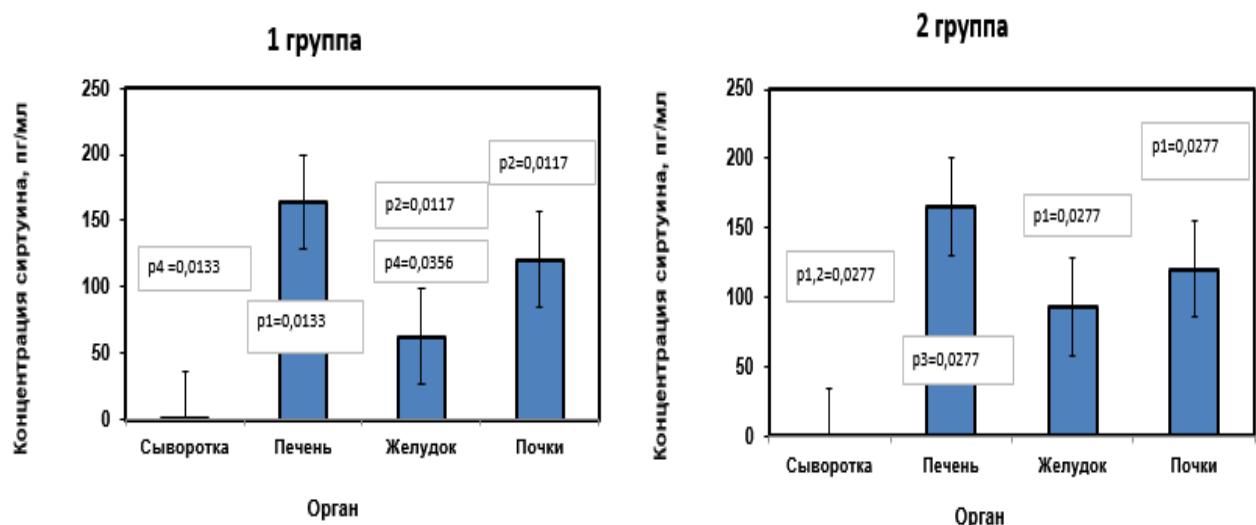


Рисунок 5 – Концентрация сиртуина в различных тканях (1 и 2 группа)

На рисунках 5,6 продемонстрировано содержание сиртуина в тканях и органах крыс отдельно в каждой группе. В первой, во второй и в третьей группах уровень сиртуина в печени выше по сравнению с другими органами и тканями.

Мы видим, что концентрация сиртуина в сыворотке имеет незначительное количество во всех трех группах. В желудке и почках также не видно особой разницы содержания сиртуина по группам. Из этого всего можно сделать вывод

о том, что сиртуин метаболизируется главным образом в печени и не зависит от типа питания.

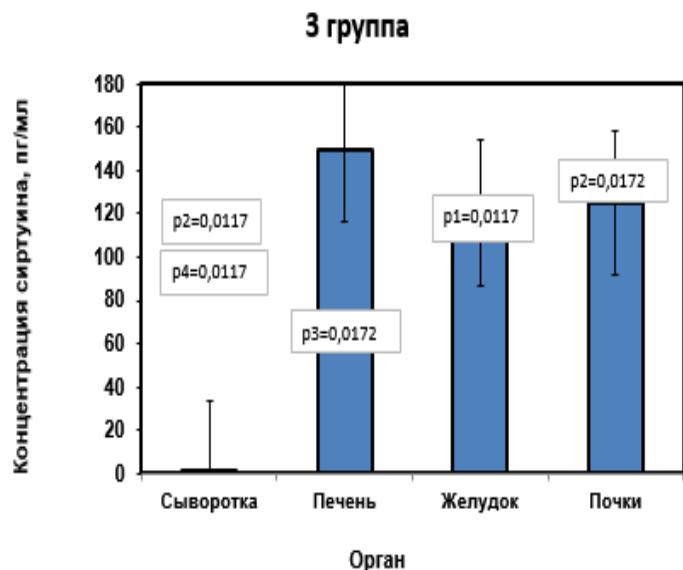


Рисунок 6 - Концентрация сиртуина в различных тканях (3 группа)

### 3.4 Содержание сиртуина: сравнение групп

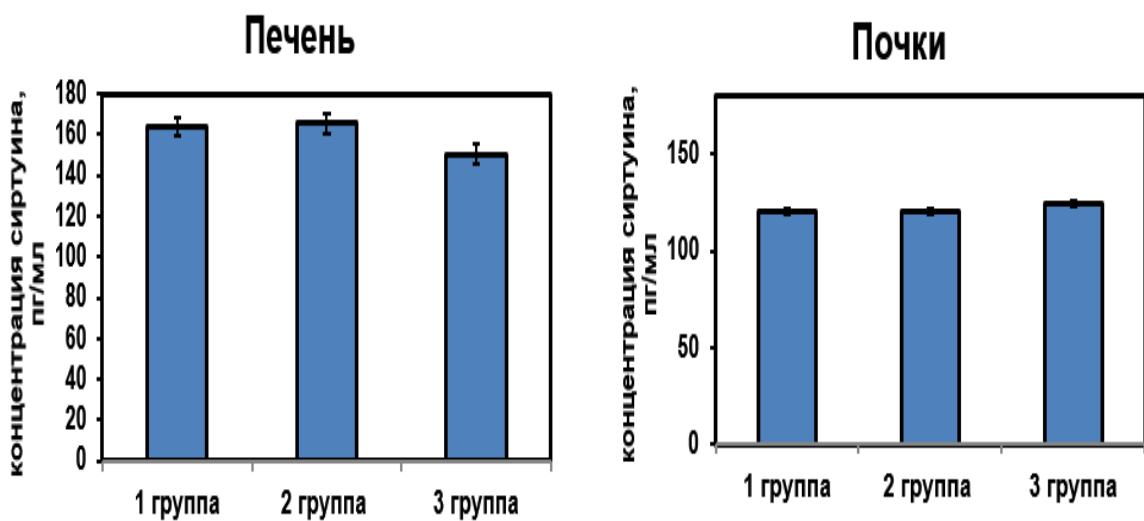


Рисунок 7 – Содержание сиртуина по группам в тканях (печень, почки)

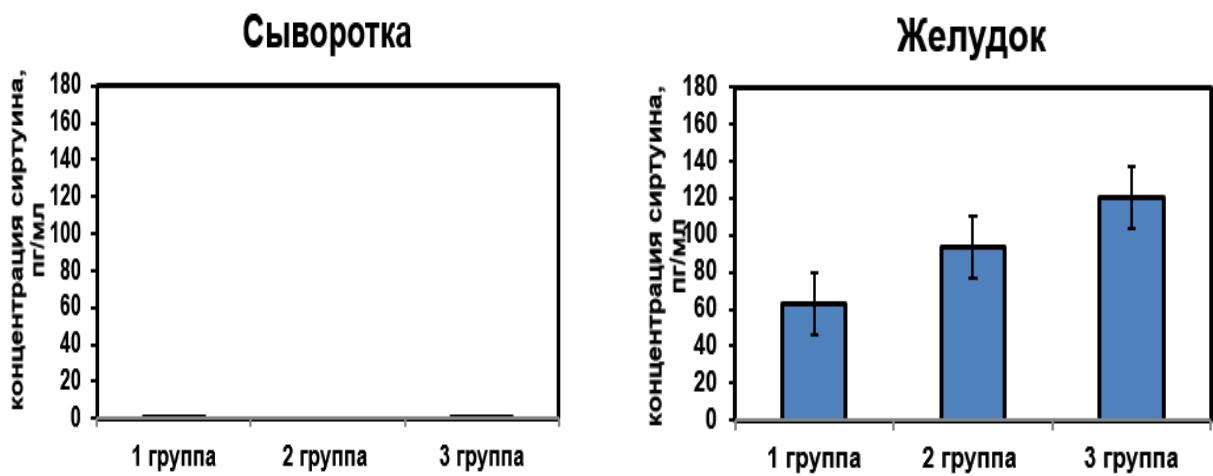


Рисунок 8 - Содержание сиртуина по группам в тканях (сыворотка, желудок)

На рисунках 7,8 продемонстрировано содержание сиртуина в тканях.

Мы видим, что концентрация сиртуина в сыворотке имеет незначительное количество во всех трех группах. В желудке также не видно особой разницы содержания сиртуина по группам. Сиртуин метаболизируется главным образом в печени и почках во всех трех группах.

### 3.5 Процентное содержание сиртуина относительно общего белка

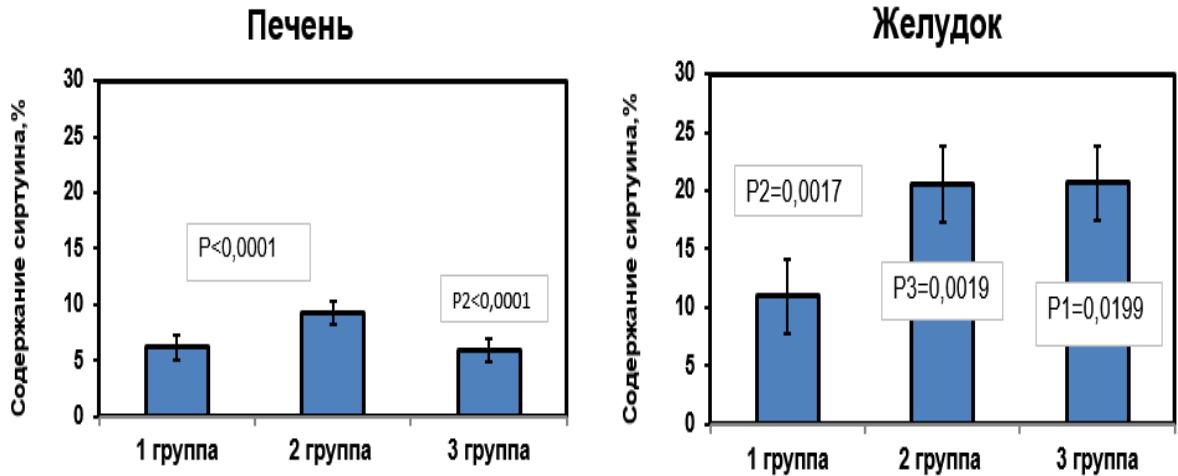


Рисунок 9 – Процентное содержание сиртуина в печени и желудке

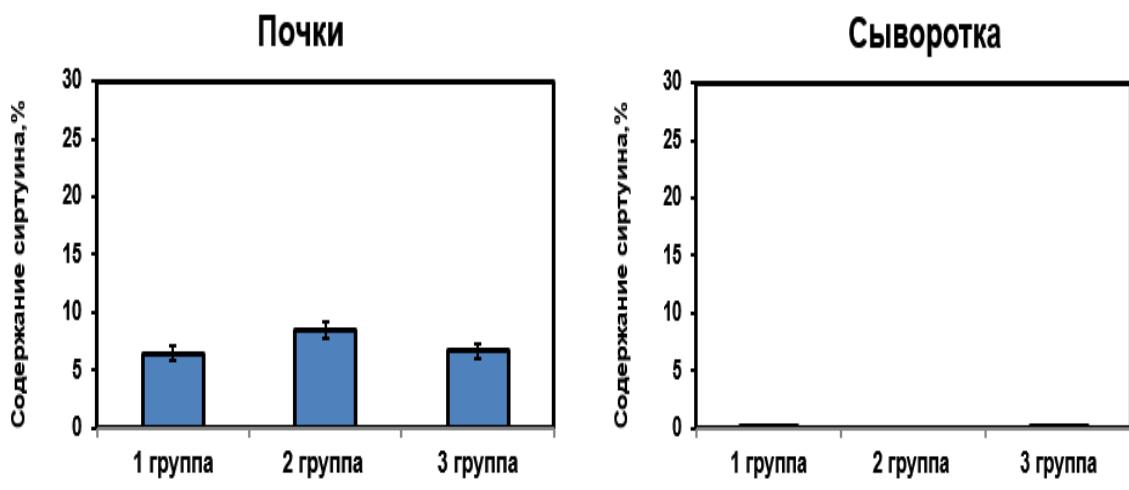


Рисунок 10 – Процентное содержание сиртуина в почках и сыворотке

Далее были проанализированы данные по процентному содержанию сиртуина относительно общего белка. В печени и в желудке все три группы имеют достоверные различия, а в почках и сыворотке различий по группам не наблюдалось.

## **ВЫВОДЫ**

1. Диета с пониженным содержанием калорий (Группа 2) приводит к снижению веса экспериментальных животных на 4-5-й неделе кормления, вследствие того, что рацион данной группы был снижен на 30%.
2. Диета (Группы 3 и 2) вызывает снижение общего содержания белка в печени, почках и желудке экспериментальных животных после 6-ти недель кормления.
3. Содержание общего белка больше всего наблюдалось в сыворотке и в печени во всех группах.
4. Метаболизация сиртуина происходит в печени, а наименьшее количество сиртуина содержит сыворотка крови.
5. Диета (Группы 3 и 2) стимулирует выработку сиртуина в желудке (возрастает его доля от общего количества белка), в то время как в остальных органах достоверных различий нет.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

КЭК – коэффициент эффективности корма

КПК – коэффициент преобразования корма

SIR2 – silent Information Regulator 2 proteins

SIRT – сиртуин

CAMP – cyclic adenosine monophosphate

ТЭИ – торгово-экономический институт

НИИ – научно-исследовательский институт

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pande S. et al. Nutritional biomarkers: Current view and future perspectives // Critical reviews in food science and nutrition. – 2018. – Т. 58. – №. 18. – С. 3055-3069.
2. ADAMIETZ P. Poly (ADP-ribose) synthase is the major endogenous nonhistone acceptor for poly (ADP-ribose) in alkylated rat hepatoma cells // European journal of biochemistry. – 1987. – Т. 169. – №. 2. – С. 365-372.
3. Ahuja N. et al. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase // Journal of Biological Chemistry. – 2007. – Т. 282. – №. 46. – С. 33583-33592.
4. Haigis M. C. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction / Guarente L. P. // Genes & development. – 2006. – Т. 20. – №. 21. – С. 2913-2921.
5. Amé J. C. et al. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly (ADP-ribose) polymerase // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Т. 274. – №. 25. – С. 17860-17868.
6. Bai P. et al. PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure // Cell metabolism. – 2011. – Т. 13. – №. 4. – С. 450-460.
7. Lin S. J. et al. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH // Genes & development. – 2004. – Т. 18. – №. 1. – С. 12-16.
8. Bai P. et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation // Cell metabolism. – 2011. – Т. 13. – №. 4. – С. 461-468.
9. Baur J. A. Biochemical effects of SIRT1 activators // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2010. – Т. 1804. – №. 8. – С. 1626-1634.
10. Bitterman K. J. et al. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1 //Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Т. 277. – №. 47. – С. 45099-45107.

11. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited // Genes & development. – 2013. – Т. 27. – №. 19. – С. 2072-2085.
12. Kong X. X. et al. Function of SIRT1 in physiology //Biochemistry (Moscow). – 2009. – Т. 74. – №. 7. – С. 703-708.
13. Sinclair D. A., Oberdoerffer P. The ageing epigenome: damaged beyond repair? //Ageing research reviews. – 2009. – Т. 8. – №. 3. – С. 189-198.
14. Sauve A. A. Sirtuin chemical mechanisms // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics. – 2010. – Т. 1804. – №. 8. – С. 1591-1603.
15. Blander G., Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases //Annual review of biochemistry. – 2004. – Т. 73. – №. 1. – С. 417-435.
16. Lin S. J. et al. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH //Genes & development. – 2004. – Т. 18. – №. 1. – С. 12-16.
17. Lin S. J. et al. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH //Genes & development. – 2004. – Т. 18. – №. 1. – С. 12-16.
18. North B. J., Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases // Genome biology. – 2004. – Т. 5. – №. 5. – С. 224.
19. Denu J. M. Vitamin B3 and sirtuin function // Trends in biochemical sciences. – 2005. – Т. 30. – №. 9. – С. 479-483.
20. Prusty D. et al. Nicotinamide inhibits Plasmodium falciparum Sir2 activity in vitro and parasite growth // FEMS microbiology letters. – 2008. – Т. 282. – №. 2. – С. 266-272.
21. Schmidt M. T. et al. Coenzyme specificity of Sir2 protein deacetylases implications for physiological regulation // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Т. 279. – №. 38. – С. 40122-40129.
22. de Cabo R. et al. An in vitro model of caloric restriction //Experimental gerontology. – 2003. – Т. 38. – №. 6. – С. 631-639.
23. Liu D. et al. Nicotinamide prevents NAD<sup>+</sup> depletion and protects neurons against excitotoxicity and cerebral ischemia: NAD<sup>+</sup> consumption by SIRT1 may endanger energetically compromised neurons // Neuromolecular medicine. – 2009. – Т. 11. – №. 1. – С. 28-42.

24. Khan J. A. et al. Nicotinamide adenine dinucleotide metabolism as an attractive target for drug discovery // Expert opinion on therapeutic targets. – 2007. – Т. 11. – №. 5. – С. 695-705.
25. Imai S. The NAD World: a new systemic regulatory network for metabolism and aging—Sirt1, systemic NAD biosynthesis, and their importance // Cell biochemistry and biophysics. – 2009. – Т. 53. – №. 2. – С. 65.
26. Osborne C. A. et al. New threshold and confidence estimates for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of complex bacterial communities // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Т. 72. – №. 2. – С. 1270-1278.
27. Estep III P. W., Warner J. B., Bulyk M. L. Short-term calorie restriction in male mice feminizes gene expression and alters key regulators of conserved aging regulatory pathways // PloS one. – 2009. – Т. 4. – №. 4. – С. e5242.
28. Allard J. S. et al. In vitro cellular adaptations of indicators of longevity in response to treatment with serum collected from humans on calorie restricted diets // PloS one. – 2008. – Т. 3. – №. 9. – С. e3211.
29. Civitarese A. E. et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans // PLoS medicine. – 2007. – Т. 4. – №. 3. – С. e76.
30. Dryden S. C. et al. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle // Molecular and cellular biology. – 2003. – Т. 23. – №. 9. – С. 3173-3185.
31. Vaquero A. et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis // Genes & development. – 2006. – Т. 20. – №. 10. – С. 1256-1261.
32. Serrano L. et al. The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation // Genes & development. – 2013. – Т. 27. – №. 6. – С. 639-653.
33. Kaeberlein M., McVey M., Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms // Genes & development. – 1999. – Т. 13. – №. 19. – С. 2570-2580.

34. Berdichevsky A. et al. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span // Cell. – 2006. – Т. 125. – №. 6. – С. 1165-1177.
35. Guarente L. Sirtuins in aging and disease // Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. – Т. 72. – С. 483-488.
36. Mair W., Dillin A. Aging and survival: the genetics of life span extension by dietary restriction // Annu. Rev. Biochem. – 2008. – Т. 77. – С. 727-754.
37. Verdin E. et al. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling // Trends in biochemical sciences. – 2010. – Т. 35. – №. 12. – С. 669-675.
38. Wang Y., Tissenbaum H. A. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO // Mechanisms of ageing and development. – 2006. – Т. 127. – №. 1. – С. 48-56.
39. Krotkiewski M., Smith U. Dietary fibre in obesity // Dietary Fiber Perspectives: Reviews and Bibliography. John Libbey & Co: London. – 1985.
40. Baer D. J. et al. Dietary fiber decreases the metabolizable energy content and nutrient digestibility of mixed diets fed to humans // The Journal of nutrition. – 1997. – Т. 127. – №. 4. – С. 579-586.
41. Zhang Z. et al. Dietary fiber intake regulates intestinal microflora and inhibits ovalbumin-induced allergic airway inflammation in a mouse model // PLoS One. – 2016. – Т. 11. – №. 2. – С. e0147778.
42. Zaiss M. M. et al. The intestinal microbiota contributes to the ability of helminths to modulate allergic inflammation // Immunity. – 2015. – Т. 43. – №. 5. – С. 998-1010.
43. Bielli A. et al. Antioxidants and vascular health // Life sciences. – 2015. – Т. 143. – С. 209-216.
44. Padhi E. M. T. et al. Total polyphenol content, carotenoid, tocopherol and fatty acid composition of commonly consumed Canadian pulses and their contribution to antioxidant activity // Journal of Functional Foods. – 2017. – Т. 38. – С. 602-611.

45. O'Reilly J. D. et al. Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F2-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans // The American journal of clinical nutrition. – 2001. – Т. 73. – №. 6. – С. 1040-1044.
46. Slyepchenko A. et al. Intestinal dysbiosis, gut hyperpermeability and bacterial translocation: missing links between depression, obesity and type 2 diabetes // Current pharmaceutical design. – 2016. – Т. 22. – №. 40. – С. 6087-6106.
47. Everard A. et al. Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity // The ISME journal. – 2014. – Т. 8. – №. 10. – С. 2116.
48. Trompette A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis // Nature medicine. – 2014. – Т. 20. – №. 2. – С. 159.
49. Trompette A. et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis // Nature medicine. – 2014. – Т. 20. – №. 2. – С. 159.
50. Марьин В. А. и др. Регулирование цветности ядра гречневой крупы // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – №. 5. – С. 41-42.
51. Мелешкина Л. Е. Изменение углеводного комплекса перловой и гречневой крупы быстрого приготовления в процессе барометрического текстурирования / Иуничина В. С., Вайтанис М. А. // Ползунов. вестн. – 2012. – №. 2. – С. 117-121.
52. Глазунова И. Рынок круп: предварительные итоги 2011 г. и тенденции на 2012 г // Хлебопродукты. – 2012. – №. 1. – С. 4-5.
53. Mattila P. et al. Nutritional value of commercial protein-rich plant products // Plant foods for human nutrition. – 2018. – Т. 73. – №. 2. – С. 108-115.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой

 В.А Кратасюк  
подпись инициалы, фамилия

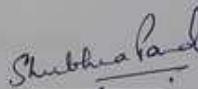
«21 » 06 2019г.

### БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология  
06.03.01.07 Биофизика

ВЛИЯНИЕ ГРЕЧНЕВОЙ КРУПЫ НА СИРТУИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ  
У ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Руководитель

 21.06.19 PhD Ш. Панде  
подпись, дата

Выпускник ББ15-01Б №041509947

 21.06.19 М.В. Рязанова  
подпись, дата

Красноярск 2019