

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038685**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.10.05**

**(21)** Номер заявки  
**201791155**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.11.11**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/0775 (2010.01)**  
**A61P 3/04 (2006.01)**  
**A61P 3/06 (2006.01)**

---

**(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФОРСКОЛИНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АДИПОГЕНЕЗА И СПОСОБЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТОВ ФОРСКОЛИНА**

---

**(31)** 14/936,830

**(32)** 2015.11.10

**(33)** US

**(43)** 2017.09.29

**(86)** PCT/US2015/060176

**(87)** WO 2017/082896 2017.05.18

**(71)(72)(73)** Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**МАДЖИД МУХАММЕД (US); БАНИ САРАНГ; ПАНДЕЙ АНДЖАЛИ (IN); НАГАБХУШАНАМ КАЛЪЯНАМ (US)**

**(74)** Представитель:  
**Харин А.В. (RU)**

**(56)** US-A1-20150030662

SUN et al., Brown adipose tissue derived VEGF-A, modulates cold tolerance and energy expenditure. Mol Metab, July 2014, Vol. 3, No 4, pp. 474, 483. Especially abstract

QIAN et al., BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 26 February 2013, Vol. 110, No 9, pp. E798-807. Especially abstract

US-A1-20050158706

YANG et al., cAMP/PKA Regulates Osteogenesis, Adipogenesis and Ratio of RANKL/OPG mRNA Abstract - Expression in Mesenchymal Stem Cells by Suppressing Leptin. PLOS ONE, 2008, Vol. 3, No 2, page e1540. Especially abstract

WO-A1-2013188138

US-A1-20150216935

---

**(57)** Описаны способы сравнительной оценки ингибирования адипогенеза форсколином и сравнительной оценки усиления экспрессии секреторных факторов с использованием форсколина на определенной физиологической стадии и стадии развития системы клеток млекопитающих. Также описано применение форсколина для ингибирования адипогенеза в адипоцитах млекопитающих.

---

**038685**

**B1**

**038685**  
**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные патентные заявки**

В данной заявке, представляющей собой подачу согласно РСТ, испрашивается приоритет по первоначальной заявке на патент США 14936830, поданной 10 ноября 2015 г.

### **Предшествующий уровень техники**

#### **Область техники**

В общем, изобретение относится к пищевым добавкам. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам сравнительной оценки ингибирования адипогенеза форсколином и сравнительной оценки усиления экспрессии секреторных факторов при использовании форсколина на определенной физиологической стадии и стадии развития системы клеток млекопитающего.

#### **Описание предшествующего уровня техники**

Подразумевают, что нарушение энергетического баланса у млекопитающих является причиной распространенных во всем мире эпидемий заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, что влечет изменения в образе жизни и особенностях питания, а также терапевтическое вмешательство. Современные знания о режимах питания, физических упражнениях, охране здоровья или стратегии применения лекарственных средств, однако, часто не позволяют поддерживать энергетический гомеостаз в организме млекопитающего, при котором оптимально достигнут совершенный баланс между накоплением энергии и расходом энергии (Elattar S. и Satyanarayana, "Can Brown Fat Win the Battle against White Fat?", J. Cell. Physiol, 11 марта 2015; Zafrir B., "Brown adipose tissue: research milestones of a potential player in human energy balance and obesity", Horm Metab Res, октябрь 2013, 45(11):774-85). Стремление к пониманию ключевых биологических процессов, контролирующих активность и дифференцировку бурых адипоцитов, является популярным, ввиду методов лечения, сфокусированных на развитии бурой жировой ткани (BAT) для энергетического гомеостаза (Giralt M., "White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? Endocrinology, сентябрь 2013, 154(9):2992-3000), когда чрезмерный избыток энергии эффективно компенсируется оптимальным расходом энергии. В настоящем изобретении обсуждают потенциал форсколина в отношении достижения энергетического баланса у млекопитающих. Соответственно, основная цель настоящего изобретения заключается в том, чтобы описать

А) способность форсколина предотвращать образование липидов в зрелых адипоцитах во время дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, когда ингибирование адипогенеза (отложения жира) значительно усилено при введении (приведении в контакт) форсколина в преадипоциты, нежели в зрелые адипоциты;

Б) способность форсколина усиливать экспрессию секреторируемых факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (BAT), таких как костный морфогенетический белок-7 (BMP-7), костный морфогенетический белок-4 (BMP-4), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A) и митохондриальный разобщающий белок 1 (UCP1), где указанная усиленная экспрессия секреторируемых факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (BAT), значительно более усилена при введении (приведении в контакт) форсколина в преадипоциты, чем в зрелые адипоциты. Другими словами, преадипоциты, обработанные форсколином, селективно способны к дифференцировке в BAT.

Согласно настоящему изобретению достигают указанных выше целей и обеспечивают дополнительные связанные с ними преимущества.

#### **Краткое описание изобретения**

В настоящем изобретении описаны

А) способность форсколина предотвращать образование липидов в зрелых адипоцитах во время дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, где ингибирование адипогенеза (отложения жира) значительно более усилено при введении форсколина в преадипоциты, чем в зрелые адипоциты;

Б) способность форсколина усиливать экспрессию секреторных факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (BAT), таких как костный морфогенетический белок-7 (BMP-7), костный морфогенетический белок-4 (BMP-4), фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) и митохондриальный разобщающий белок 1 (UCP1), где указанная усиленная экспрессия секреторируемых факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (BAT), значительно усилена при введении форсколина в преадипоциты, по сравнению с введением в зрелые адипоциты. Другими словами, преадипоциты, обработанные форсколином, селективно способны к дифференцировке в BAT.

Преимущества настоящего изобретения включают демонстрацию способов сравнительной оценки ингибирования адипогенеза форсколином и сравнительной оценки усиления экспрессии секреторных факторов при использовании форсколина на определенной физиологической стадии и стадии развития системы клеток млекопитающего, где форсколин демонстрирует больший потенциал в отношении (i) ингибирования адипогенеза и (ii) усиления экспрессии секреторируемых факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (BAT), таких как костный морфогенетический белок-7 (BMP-7), костный морфогенетический белок-4 (BMP-4), фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) и митохондриальный разобщающий белок 1 (UCP1), при введении в преадипоциты, чем в зрелые адипоциты.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения очевидны из следующего более подробного описания в совокупности с сопровождающими графическими материалами, которые иллюстрируют в качестве примера принцип данного изобретения.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано графическое представление BMP-7 в супернатанте клеточной культуры культивируемых адипоцитов 3T3-L1 при добавлении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) соответственно перед дифференцировкой преадипоцитов в адипоциты и после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты.

На фиг. 2 показано графическое представление BMP-4 в супернатанте клеточной культуры культивируемых адипоцитов 3T3-L1 при добавлении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) соответственно перед дифференцировкой преадипоцитов в адипоциты и после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты.

На фиг. 3 показано графическое представление VEGF-A в супернатанте клеточной культуры культивируемых адипоцитов 3T3-L1 при добавлении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) соответственно перед дифференцировкой преадипоцитов в адипоциты и после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты.

На фиг. 4 показано графическое представление UCP1 в супернатанте клеточной культуры культивируемых адипоцитов 3T3-L1 при добавлении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) соответственно перед дифференцировкой преадипоцитов в адипоциты и после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты.

### Подробное описание наиболее предпочтительных воплощений (фиг. 1, 2, 3 и 4)

В наиболее предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к способу сравнительной оценки ингибирования адипогенеза форсколином при добавлении форсколина отдельно к преадипоцитам перед дифференцировкой и к зрелым адипоцитам, причем указанный способ включает следующие стадии:

А) посев преадипоцитов млекопитающих в лунки микропланшетов, где приблизительно  $60 \times 10^4$  клеток высевает в течение 48-72 ч для получения 70-80% конfluenceности;

Б) добавление форсколина в концентрациях 50 мкг/мл и 100 мкг/мл в предварительно засеянные микропланшеты стадии А, состоящие из недифференцированных преадипоцитов;

В) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза;

Г) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза на стадии В;

Д) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C;

Е) фиксирование клеток стадии Д посредством добавления 100 мкл 10% формалина и окрашивание с использованием масляного красного О;

Ж) снятие значений оптической плотности клеток стадии Е при 492 нм в микропланшетном ридере и выражение результатов в виде значений 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism;

З) расчет выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках с использованием формулы  $C-T/T \times 100$ , где С представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках и Т представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках, обработанных образцом;

И) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза стадии А;

К) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза, содержащей возрастающие концентрации форсколина 50 мкг/мл и 100 мкг/мл соответственно, в лунки стадии И после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза;

Л) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C;

М) фиксирование клеток стадии Л посредством добавления 100 мкл 10% формалина и окрашивание с использованием масляного красного О;

Н) снятие значений оптической плотности клеток стадии М при 492 нм в микропланшетном ридере и выражение результатов в виде значений 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism;

О) расчет выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках с использованием формулы  $C-T/T \times 100$ , где С представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках и Т представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках, обработанных образцом; и

П) сравнение выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках стадий З и О, где стадию А повторяют перед стадией И.

В другом наиболее предпочтительном воплощении настоящее изобретение также относится к способу сравнительной оценки усиления экспрессии секреторных факторов, которые селективно рекрути-

руют бурю жировую ткань (ВАТ), при введении форсколина в преадипоциты и в зрелые адипоциты, причем указанный способ включает следующие стадии:

А) посев преадипоцитов млекопитающих в лунки микропланшетов, где приблизительно  $60 \times 10^4$  клеток высевает в течение 48-72 ч для получения 70-80% конfluenceности;

Б) добавление форсколина в концентрациях 50 мкг/мл и 100 мкг/мл в предварительно засеянные микропланшеты стадии А, состоящие из недифференцированных преадипоцитов;

В) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза;

Г) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза на стадии В;

Д) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  и 95% воздуха, при 37°C;

Е) количественное определение усиления экспрессии секреторных факторов в клеточном супернатанте;

Ж) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза стадии А;

З) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза, содержащей возрастающие концентрации форсколина 50 мкг/мл и 100 мкг/мл соответственно, в лунки стадии Ж после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза;

И) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  и 95% воздуха при 37°C; и

К) количественное определение усиления экспрессии секреторных факторов в клеточном супернатанте;

Л) сравнение усиления экспрессии секреторных факторов в стадиях Е и К, где стадию А повторяют перед стадией Ж, и где секреторные факторы выбраны из группы, состоящей из костного морфогенетического белка-7 (BMP-7), костного морфогенетического белка-4 (BMP-4), фактора роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) и митохондриального разобщающего белка 1 (UCP1).

В еще одном наиболее предпочтительном воплощении изобретение относится к применению форсколина для ингибирования адипогенеза в адипоцитах млекопитающих.

#### Иллюстративные примеры

В качестве иллюстративных примеров наиболее предпочтительных воплощений, изложенных выше в данном документе, следующие результаты представлены для того, чтобы показать, что форсколин при введении в возрастающей концентрации является более эффективным в (а) предотвращении адипогенеза и (б) также в стимулировании экспрессии секреторных факторов, таких как BMP-7, BMP-4, VEGF-A и UCP1, которые рекрутируют бурые адипоциты, при введении на стадии преадипоцитов, чем когда произошло превращение преадипоцитов в адипоциты.

#### Результат 1. Предотвращение адипогенеза.

КОНЦЕНТРАЦИЯ (мкг/мл)	Ингибирование адипогенеза при добавлении форсколина на стадии преадипоцитов (перед дифференцировкой в адипоциты), %	Ингибирование адипогенеза при добавлении форсколина после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, %
6,25	10,2	1,2
12,50	12,8	6,8
25	19,7	10,6
50	35,5	12,9
100	41,8	18,5

В таблице показано, что при каждой тестируемой концентрации форсколина введение форсколина на стадии преадипоцитов млекопитающих оказывает сильное действие на предотвращение адипогенеза по сравнению с действием при введении после дифференцировки преадипоцитов в адипоциты. Двукратное или более чем двукратное ингибирование, выраженное в процентах, наблюдают при введении форсколина на стадии преадипоцитов по сравнению с введением на стадии адипоцитов.

#### Результат 2. Экспрессия секреторных белков, которые рекрутируют бурые адипоциты.

##### А. BMP-7.

Биологическую роль BMP-7 как рекрутера линии дифференцировки бурых адипоцитов обсуждают в следующей научной литературе:

1. Mathew Harms и Patrick Seale, "Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential", Nature Medicine, т. 19, № 10, октябрь 2013, стр. 1252-1263.

2. BMP7 Activates Brown Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity at Sub thermoneutrality. Mariette R. Boon, опубликовано 16 сентября 2013, PLOS One.

3. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. Tseng и др. Nature, 21 августа 2008; 454(7207): 1000-4, doi: 10.1038/nature07221.

4. Transcriptional Control of Brown Fat Development. Kajimure и др. *Cell Metabolism*; т. 11, изд. 4, 7 апреля 2010, стр. 257-262.

Иммуноанализы (иммуноферментный анализ) для количественной оценки BMP-7 в супернатанте клеточной культуры при введении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) на стадии преадипоцитов и сразу после того, как произошла дифференцировка в адипоциты, показали, что форсколин сильно повышал экспрессию BMP-7 на стадии преадипоцитов по сравнению со стадией адипоцитов.

Таким образом, при сопоставлении с приведенной выше литературой можно сделать вывод о том, что форсколин демонстрирует большой потенциал преадипоцитов в отношении превращения бурого жира (фиг. 1), чем полностью дифференцированных белых адипоцитов. Пример, представленный на фиг. 1, обеспечивает обоснованность описанного наиболее предпочтительного воплощения, что форсколин направляет селективную дифференцировку преадипоцитов млекопитающих в бурые адипоциты, делая возможной экспрессию секреторного фактора BMP-7.

#### Б. BMP-4.

Действуя вместе с BMP-7 BMP-4 представляет собой новый адипокин и воздействует на адипогенез и превращение белых адипоцитов в бурые (Qian S.W. и др. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 110: E798-807, 2013). Иммуноанализы (иммуноферментный анализ) для количественной оценки BMP-4 в супернатанте клеточной культуры при введении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) на стадии преадипоцитов и сразу после того, как произошла дифференцировка в адипоциты, показали, что форсколин сильно повышал экспрессию BMP-4 на стадии преадипоцитов по сравнению со стадией адипоцитов.

Таким образом, при сопоставлении с приведенной выше литературой можно сделать вывод о том, что форсколин демонстрирует большой потенциал в отношении превращения белых преадипоцитов в бежевые адипоциты (адипоциты, подобные бурым) (фиг. 2) в результате сочетания усиленной экспрессии и биологического действия секреторных факторов BMP-4 и BMP-7. Пример, представленный на фиг. 2, обеспечивает обоснованность наиболее предпочтительного воплощения, что форсколин обеспечивает превращение белых преадипоцитов в бежевые адипоциты.

#### В. VEGF-A.

Сверхэкспрессия VEGF-A приводит к повышению термогенеза в бурой жировой ткани (BAT), а также стимулирует "BAT-подобный" фенотип в депо белой жировой ткани. У мышей с алиментарным ожирением локальное введение VEGF-A в BAT избавляет от капиллярного разрежения, восстанавливает дисфункцию бурых адипоцитов и снижает вредные воздействия на метаболизм глюкозы и липидов, вызванные рационом с высоким содержанием жиров. Данные результаты демонстрируют непосредственную положительную роль VEGF-A в активации и разрастании BAT. Сверхэкспрессия VEGF-A также оказывает свое действие на макрофаги посредством усиления рекрутирования противовоспалительных макрофагов M2 в жировые депо. Сниженный уровень ожирения и противовоспалительная среда, вызванные VEGF-A в жировой ткани, обуславливают понижение инсулинорезистентности у трансгенных мышей (Bagchi и др., "Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance", *FASEB J.* 27, 3257-3271 (2013). Иммуноанализы (иммуноферментный анализ) для количественной оценки VEGF-A в супернатанте клеточной культуры при введении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) на стадии преадипоцитов и сразу после того, как произошла дифференцировка в адипоциты, показали, что форсколин сильно повышал экспрессию VEGF-A на стадии преадипоцитов по сравнению со стадией адипоцитов. Таким образом, при сопоставлении с приведенной выше литературой можно сделать вывод о том, что форсколин демонстрирует большой потенциал в отношении превращения белых преадипоцитов в клетки, подобные бурым адипоцитам (бежевые) (фиг. 3), среди депо белых адипоцитов в организме млекопитающего.

#### Г. Разобщающий белок 1 (UCP1).

Система термогенеза, которая эволюционировала для защиты организма от гипотермии, основана на разобщении окислительного фосфорилирования в бурых адипоцитах посредством митохондриального разобщающего белка 1 (UCP1). Показано, что повышенная регуляция UCP1 посредством генетических манипуляций или лекарственных агентов может уменьшать ожирение и улучшать чувствительность к инсулину (*International Journal of Obesity* (2008) 32, S32-S38; doi:10.1038/ijo.2008.236 UCP1: its involvement and utility in obesity. L.P. Kozak и R. Anunciado-Koza). Иммуноанализы (иммуноферментный анализ) для количественной оценки UCP1 в супернатанте клеточной культуры при введении форсколина (50 мкг/мл и 100 мкг/мл) на стадии преадипоцитов и сразу после того, как произошла дифференцировка в адипоциты, показали, что форсколин сильно повышал экспрессию UCP1 на стадии преадипоцитов по сравнению со стадией адипоцитов. Таким образом, при сопоставлении с приведенной выше литературой, можно сделать вывод о том, что форсколин демонстрирует большой потенциал в отношении превращения преадипоцитов в BAT-подобные или бурые адипоциты, и усиленная экспрессия UCP1 в данных клетках, как можно ожидать, стимулирует обеспечение энергетического баланса через соответствующий расход энергии (фиг. 4).

Уже сообщалось, что введение форсколина у человека явно не вызывает клинически значимых побочных эффектов (Shonteh Henderson и др., *Effect of Coleus forskolii supplementation on body composition and haematological profiles in mildly overweight women*, *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2005; 2(2): 54-62). Исследо-

вание устанавливает, что добавление пищевой добавки на основе форсколина Forslean® (250 мг 10% экстракта *Coleus forskolii*, 25 мг форсколина) два раза в сутки в течение 12 недель явно не оказывало клинических побочных эффектов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что иллюстративные примеры *in vitro*, включенные выше в данный документ, с достижением энергетического баланса в системах адипоцитов млекопитающих, также применимы для исследований *in vivo* на животных (млекопитающих), включая человека.

Несмотря на то что изложенное выше изобретение описывают довольно подробно путем иллюстрации и примера в целях ясности понимания, очевидно, что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения можно осуществлять на практике определенные изменения и модификации.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сравнительной оценки ингибирования адипогенеза форсколином, добавляемым отдельно к преадипоцитам перед дифференцировкой и к зрелым адипоцитам, причем указанный способ включает следующие стадии:

А) посев преадипоцитов млекопитающих в лунки микропланшетов, где приблизительно  $60 \times 10^4$  клеток высевает в течение 48-72 ч для получения 70-80% конfluenceности;

Б) добавление форсколина в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в предварительно засеянные микропланшеты стадии А, состоящие из недифференцированных преадипоцитов;

В) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза;

Г) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза на стадии В;

Д) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C;

Е) фиксирование клеток стадии Д посредством добавления 100 мкл 10% формалина и окрашивание с использованием масляного красного О;

Ж) считывание значений оптической плотности клеток стадии Е при 492 нм в микропланшетном ридере и выражение результатов в виде значений 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism;

З) расчет выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках с использованием формулы  $C-T/T \times 100$ , где С представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках и Т представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках, обработанных образцом;

И) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза стадии А;

К) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза, содержащей возрастающие концентрации форсколина 50 и 100 мкг/мл соответственно, в лунки стадии И после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза;

Л) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C;

М) фиксирование клеток стадии Л посредством добавления 100 мкл 10% формалина и окрашивание с использованием масляного красного О;

Н) считывание значений оптической плотности клеток стадии М при 492 нм в микропланшетном ридере и выражение результатов в виде значений 50% ингибирующей концентрации (IC<sub>50</sub>) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism;

О) расчет выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках с использованием формулы  $C-T/T \times 100$ , где С представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках и Т представляет собой поглощение масляного красного О в дифференцирующихся/недифференцированных клетках, обработанных образцом; и

П) сравнение выраженного в процентах ингибирования адипогенеза в клетках стадий З и О, где стадию А повторяют перед стадией И.

2. Способ сравнительной оценки усиления экспрессии секреторных факторов, которые селективно рекрутируют бурую жировую ткань (ВАТ), при введении форсколина в преадипоциты и в зрелые адипоциты, причем указанный способ включает следующие стадии:

А) посев преадипоцитов млекопитающих в лунки микропланшетов, где приблизительно  $60 \times 10^4$  клеток высевает в течение 48-72 ч для получения 70-80% конfluenceности;

Б) добавление форсколина в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в предварительно засеянные микропланшеты стадии А, состоящие из недифференцированных преадипоцитов;

В) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза;

Г) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза на стадии В;

Д) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C;

Е) количественное определение усиления экспрессии секреторных факторов в клеточном супернатанте;

Ж) добавление в лунки 200 мкл свежеприготовленной среды для индукции адипогенеза стадии А;

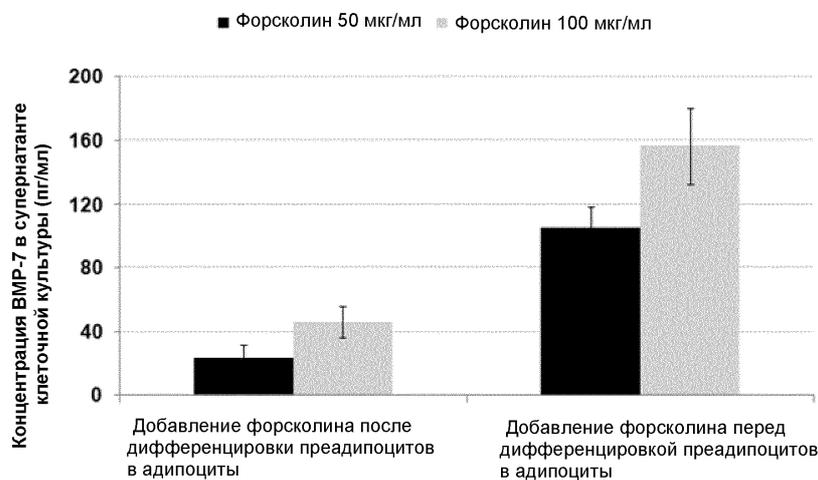
З) добавление 200 мкл свежеприготовленной среды для развития адипогенеза, содержащей возрастающие концентрации форсколина 50 и 100 мкг/мл соответственно, в лунки стадии Ж после 72 ч инкубации со средой для индукции адипогенеза;

И) инкубирование клеток, обработанных форсколином, средой для индукции адипогенеза и средой для развития адипогенеза, в течение 48 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха, при 37°C; и

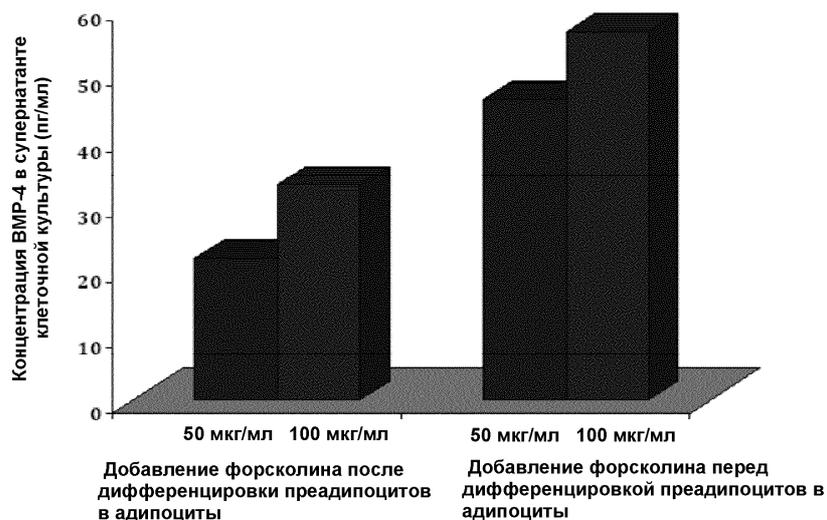
К) количественное определение усиления экспрессии секреторных факторов в клеточном супернатанте;

Л) сравнение усиления экспрессии секреторных факторов в стадиях Е и К, где стадию А повторяют перед стадией Ж, и где секреторные факторы выбраны из группы, состоящей из костного морфогенетического белка-7 (BMP-7), костного морфогенетического белка-4 (BMP-4), фактора роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A) и митохондриального разобщающего белка 1 (UCP1).

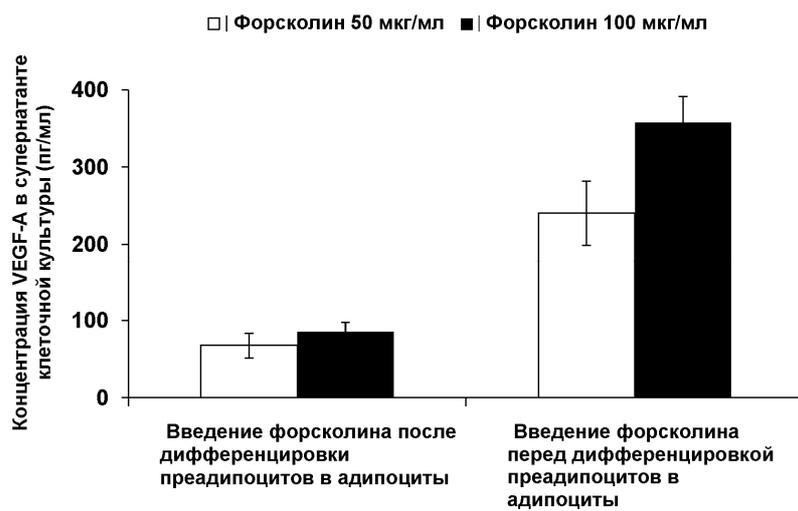
3. Применение форсколина для ингибирования адипогенеза в адипоцитах млекопитающих.



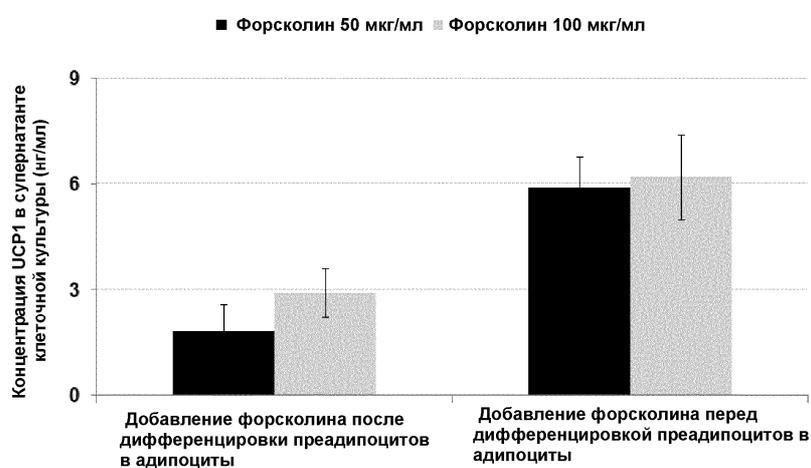
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

