

На правах рукописи

Петров Никита Александрович

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА IN VIVO ИННОВАЦИОННЫХ ПИЩЕВЫХ
ИНГРЕДИЕНТОВ – БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С
БИОПОЛИМЕРНЫМИ МАТРИЦАМИ**

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре питания, биотехнологии и безопасности пищи

Научный руководитель:

Член-корреспондент РАН,
доктор технических наук, профессор,
заведующий лабораторией
пищевых биотехнологий
и специализированных продуктов
ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»
Кочеткова Алла Алексеевна

Официальные оппоненты:

Муронец Владимир Израилевич
доктор биологических наук, профессор
заведующий отделом биохимии животной клетки
НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ

Коваленко Людмила Васильевна
доктор медицинских наук, профессор
заведующая кафедрой
патофизиологии и общей патологии
БУ ВО «Сургутский государственный университет»

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «» _____ 20__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.241.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» <http://www.ion.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Шумакова Антонина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Растительные полифенолы и фитоэкдистероиды являются минорными биологически активными веществами (БАВ) пищи, проявляющими антиоксидантные, гиполипидемические и гипогликемические свойства. Эффективность использования растительных полифенолов при метаболических нарушениях подтверждается результатами многочисленных опытов на лабораторных животных, в том числе с индуцированными или генетически обусловленными нарушениями углеводного и/или жирового обмена. Растительные полифенолы, как и другие облигатные антиоксиданты пищи, поступив в организм, становятся компонентами антиоксидантной системы, с чем, в частности, в значительной степени и связаны проявляемые ими эффекты. Влияние полифенольных соединений на клеточном уровне и соответственно проявление фармакологического действия во многом определяется взаимодействием с клеточными мембранами [Bohn T., 2014]. Это взаимодействие, зависящее от способности полифенолов проникать через фосфолипидный бислой и локализоваться в мембране, сказывается на фазовом состоянии липидов мембраны и её структурной организации [Han M.K., 2003]. В клеточной цитоплазме полифенолы могут воздействовать на активность различных ферментов и влиять на экспрессию ядерных и цитоплазматических белков, участвовать в сигнальных системах клетки [Luo G. et al., 2016; Negri A. et al., 2018]. Большое разнообразие полифенольных соединений содержится в ягодах и листьях черники, традиционно используемых в народной медицине при нарушениях углеводного обмена.

Широкий спектр биологической активности, проявляемый одним из наиболее изученных фитоэкдистероидов - 20-гидроксиэкдизоном, в настоящее время находит объяснение на примере участия этого соединения в P3K пути активации серин-треониновой протеинкиназы B (PKB), обозначаемой также как PKB/Akt, или просто Akt-сигнальной макромолекулы, являющейся ключевой в регуляции клеточной активности. Гипотезой, связывающей проявление адаптогенного эффекта 20-гидроксиэкдизона с его структурным соответствием стресс-медиатору, является представление о том, что это соединение выступает в роли «мягкого прострессора», снижающего «избыточное» возрастание стресс-медиаторов при последующем стрессорном воздействии. Согласно этой гипотезе, адаптационное воздействие 20-гидроксиэкдизона на клеточном уровне может иметь определенное сходство с действием структурно близких ему глюкокортикостероидов. К числу перспективных источников 20-гидроксиэкдизона, а также флавоноидов, относится зерно черного киноа.

Согласно вышеизложенному, представляется перспективным включение растительных полифенолов и фитоэкдистероидов в качестве пищевых ингредиентов в составы специализированных пищевых продуктов для профилактики и/или коррекции нарушений углеводного и липидного обмена, а также специализированных пищевых продуктов с адаптогенными свойствами, что требует, целенаправленного извлечения этих соединений из растительного сырья. Взаимодействие (комплексирование) с пищевой матрицей, основой которой являются биополимеры разной природы, априори может влиять на биологическую активность извлеченных и сконцентрированных минорных БАВ. В этом случае объектами разработок и исследований являются новые виды пищевых ингредиентов - биологически активные соединения с биополимерными матрицами. На первом этапе работы в качестве модельной системы был получен пищевой ингредиент – полифенольные соединения экстракта листьев черники, сорбированные на белково-углеводной матрице. В качестве матрицы для сорбирования полифенольных соединений, экстрагируемых из листьев или ягод черники, была выбрана измельченная гречневая мука. Помимо общедоступности и относительно низкой стоимости, гречневая мука является перспективной матрицей для создания пищевого ингредиента благодаря низкому гликемическому индексу, а также содержащимся в ее составе полифенольным соединениям. Коагулированный белок куриного яйца был выбран в качестве белковой матрицы для сорбирования смеси 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов, экстрагируемой из зерна черного киноа, благодаря простоте получения, а также высокому аминокислотному скору, близкому к идеальному.

Соответственно, для оценки потенциальной эффективности биологически активных веществ в виде пищевых ингредиентов - минорных БАВ, сорбированных на полимерных пищевых матрицах, необходимо выполнение доклинической оценки в виде сравнительного физиолого-биохимического исследования их биологической активности в опытах *in vivo*. С позиций доказательной медицины доклиническое исследование гипогликемических /гиполипидемических или адаптогенных свойств БАВ *in vivo* должно проводиться в условиях биомоделирования нарушений углеводного/липидного обмена или стрессорных воздействий.

В соответствии с вышеизложенным **целью исследования** явились получение и физиолого-биохимическая оценка биологической активности *in vivo* пищевых ингредиентов - полифенолов, экстрагированных из листьев или ягод черники, а также смеси фитоэкдистероида 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа в составе концентратов с полимерными пищевыми матрицами растительного (гречневая мука) и животного (коагулированный белок куриного яйца) происхождения.

Задачи исследования

1. Оптимизация условий сорбции полифенолов из экстрактов листьев и ягод черники на измельченной гречневой муке.
2. Определение профиля полифенолов, экстрагированных из листьев и ягод черники и сорбированных на измельченной гречневой муке.
3. Определение стабильности полифенолов из листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке при хранении.
4. Экстракция смеси 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа и их сорбция на коагулированном белке куриного яйца.
5. Определение содержания 20-гидроксиэкдизона и профиля флавоноидов, экстрагированных из зерна черного киноа, и сорбированных на коагулированном белке куриного яйца.
6. Проведение экспериментов *in vivo* по сравнительной физиолого-биохимической оценке влияния потребления полифенолов, экстрагированных из листьев или ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, на нарушения углеводного и/или липидного обмена у мышей линии C57Bl/6, индуцированные потреблением высоко-жирового высоко-углеводного рациона.
7. Разработка и воспроизведение на лабораторных животных (крысах линии Вистар) двух моделей стрессорного воздействия: принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки на беговой дорожке.
8. Проведение эксперимента *in vivo* по сравнительной физиолого-биохимической оценке влияния концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов, экстрагированных из зерна черного киноа и сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, на основные стресс-маркеры и биохимические показатели крыс линии Вистар, подвергнутых принудительной иммобилизации.
9. Проведение эксперимента *in vivo* по сравнительной физиолого-биохимической оценке влияния 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов, экстрагированных из зерна черного киноа и сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, на основные стресс-маркеры и биохимические показатели крыс линии Вистар, подвергнутых истощающей физической нагрузке на беговой дорожке.

Степень разработанности проблемы

В современной научной литературе относительно подробно проанализированы на клеточном и молекулярном уровне механизмы, посредством которых реализуются гипогликемические и гиполипидемические эффекты полифенольных соединений: ингибирование переваривания углеводов и всасывания глюкозы в кишечнике, стимуляция секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, модуляция выработки глюкозы в печени и её высвобождения, активация рецепторов инсулина, поглощение глюкозы тканями, чувствительными к инсулину [Сао Н. et al., 2019; Song J. et al., 2022; Xiong S. et al., 2019].

В области клинической нутрициологии обсуждается также проблема использования в качестве фитоадаптогенов, повышающих устойчивость организма человека к неблагоприятным стрессорным воздействиям различного генеза, фитоэкдистероидов [Das N. et al., 2020].

Множественность (плейотропность) биологического действия 20-гидроксиэкдизона, как наиболее изученного экдистероида, объясняется его участием в PI3K пути активации серин-треониновой протеинкиназы В (РКВ), являющейся ключевой в регуляции клеточной активности [Соловьева А. Г. и др., 2021]. Эффективность использования полифенолов и фитоэкдистероидов как минорных БАВ пищи в составе специализированных пищевых продуктов лимитируется их низкой биодоступностью, часто не позволяющей в клинических условиях достигать ожидаемых благоприятных эффектов. Соответственно, перспективна разработка методов целенаправленного извлечения этих соединений из растительного сырья и их концентрирования. Для оценки потенциальной эффективности новых пищевых ингредиентов в виде концентратов растительных полифенолов, экстрагированных из листьев или ягод черники, и мажорного фитоэкдистероида 20-гидроксиэкдизона, экстрагированного в смеси с флавоноидами из зерна черного киноа, с полимерными пищевыми матрицами в составе специализированных пищевых продуктов, в работе проведено сравнительное физиолого-биохимическое исследование их биологической активности в опытах *in vivo*.

Научная новизна

Впервые получены пищевые ингредиенты - концентраты полифенолов (флавоноидов и антоцианинов) листьев или ягод черники, сорбированные на полимерной белково-углеводной матрице (измельченной гречневой муке). Количественно охарактеризован профиль сорбированных полифенолов.

Впервые установлено, что потребление в течение 130 суток концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице, снижает уровень глюкозы крови, предотвращает развитие толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности, регулирует уровни лептина и грелина в крови молодых половозрелых мышей-самцов линии C57B/6 с нарушениями углеводного и жирового обмена, индуцированными высокожировым высокоуглеводным (ВЖВУ) рационом.

Впервые показано регулирующее влияние потребления в течение 109 суток концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице, на уровень инсулина и лептина в крови молодых половозрелых мышей-самцов линии C57B/6 с нарушениями углеводного и жирового обмена, индуцированными ВЖВУ рационом.

Впервые установлен анксиолитический эффект потребления в течение 109 суток концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на полимерной белково-углеводной матрице, на молодых половозрелых мышей линии C57B/6.

Впервые получен концентрат 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, и определен его состав.

Критерию научной новизны отвечают также данные об адаптогенном действии на молодых крыс-самцов линии Вистар концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца: снижение тревожности в условиях принудительной иммобилизации (в течение 3 часов) и регуляция экскреции катехоламинов с мочой после физической нагрузки.

Экспериментальные исследования, посвященные разработке, характеристике и физиолого-биохимической оценке *in vivo* модельного пищевого ингредиента 1 – концентрата полифенолов экстракта листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, выполнены в рамках гранта РНФ (Проект № 14-36-00041).

Экспериментальные исследования, посвященные разработке, характеристике и физиолого-биохимической оценке *in vivo* модельного пищевого ингредиента 2 – концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, выполнены в рамках государственной бюджетной темы (Проект № 0529-2019-0055).

Экспериментальные исследования, посвященные разработке, характеристике и физиолого-биохимической оценке *in vivo* модельного пищевого ингредиента 3 – концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, выполнены в рамках гранта РНФ (Проект № 19-16-00107).

Научно-практическая значимость

Научно-практическая значимость выполненной работы определяется сочетанием разработки технологического подхода, направленного на получение пищевых ингредиентов путем целевого извлечения и концентрирования растительных минорных БАВ с их последующей сорбцией на пищевых матрицах различной биополимерной природы, с комплексным физико-химическим исследованием *in vitro* и физиолого-биохимическим исследованием их эффективности тестированием *in vivo*.

Масштабирование разработанных технологических подходов к получению концентратов полифенолов листьев и ягод черники с белково-углеводной матрицей и концентратов 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, позволит получать новые пищевые ингредиенты для включения в состав специализированной пищевой продукции.

В практическом плане также важны полученные в работе результаты, свидетельствующие о том, что сорбированные на измельченной гречневой муке полифенолы листьев черники сохраняли стабильность в течение 161 часа в условиях, моделирующих температурно-влажностные воздействия при хранении: температуре 50°C и относительной влажности воздуха 50%.

Практически значимым результатом проведенного экспериментального физиолого-биохимического исследования гипогликемических и гиполипидемических свойств концентратов полифенолов листьев и ягод черники, сорбированных на пищевой углеводно-белковой матрице (измельченной гречневой муке), явилось доклиническое подтверждение их эффективности с целью использования в качестве функциональных пищевых ингредиентов в составе специализированных пищевых продуктов, предназначенных для питания лиц с нарушениями углеводного и/или жирового обмена. В рамках государственного задания № 0529-2019-0055 проведены клинические испытания нового специализированного пищевого продукта, включающего разработанный пищевой ингредиент – «Концентрата киселя с бета-глюканами, полифенолами, витаминами».

Полученные *in vivo* результаты физиолого-биохимического тестирования, подтверждающие антистрессорные свойства концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированного на коагулированном белке куриного яйца, обосновывают перспективность его использования в качестве функционального пищевого ингредиента специализированной пищевой продукции, повышающей устойчивость организма человека к неблагоприятным стрессорным воздействиям.

По результатам выполненного исследования были разработаны лабораторные регламенты получения функциональных пищевых ингредиентов – концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, и концентрата флавоноидов и фитоэкдистероидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца.

Методология и методы исследования

В работе использовали физико-химические методы для качественного и количественного анализа содержания биологически активных веществ в полученных концентратах. В экспериментах *in vivo* использовали молодых половозрелых мышей-самцов линии C57Bl/6 (возраст 5 недель) и молодых половозрелых крыс-самцов линии Вистар (возраст 5 недель). При проведении оценки *in vivo* полученных концентратов применяли физиологические и биохимические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный метод получения концентрата полифенолов листьев черники с измельченной гречневой мукой позволяет увеличивать стабильность полифенолов в составе концентрата.

2. Разработанный метод препаративного выделения из ягод черники и концентрирования полифенольных соединений увеличивает их содержание в составе концентрата более чем в пять раз по сравнению с исходным (в ягодах).

3. Разработанный метод препаративного выделения из зерна черного киноа и концентрирования 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов увеличивает их содержание в составе концентрата более чем в двадцать и пятьдесят раз, соответственно, по сравнению с исходным (в зерне черного киноа).

4. Потребление концентратов полифенолов листьев или ягод черники с измельченной гречневой мукой оказывает гипогликемическое и гиполипидемическое действие на молодых мышей-самцов линии C57Bl/6 с 15 нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными высокожировым высокоуглеводным рационом.

5. Потребление концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца молодыми крысами-самцами линии Вистар, подверженными принудительной иммобилизации, достоверно снижает суточную экскрецию катехоламинов (норадреналина и адреналина) и оказывает гиполипидемическое действие.

6. Потребление концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца молодыми крысами-самцами линии Вистар, подверженными истощающей физической нагрузке, достоверно снижает суточную экскрецию простагландина E2 и оказывает гиполипидемическое действие.

Степень достоверности результатов

Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также статистической обработкой данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 23 и Microsoft Excel 2007. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Апробация материалов диссертации

Результаты исследований были представлены на Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи» (Москва, 2017), II Белорусском биохимическом конгрессе (Гродно, Беларусь, 2018), конференции «Актуальные вопросы создания функциональных продуктов птицеводства и других областей пищевой промышленности» (Ржавки, 2018), Школе молодых ученых «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний» (Москва, 2019), Международной научно-технической конференции «Исследования и последние достижения в АПК и биотехнологиях (ABR 2021)» (Краснодар, 2021), IV Школе молодых ученых с международным участием «Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний. Микронутриенты и минорные биологически активные вещества пищи» (Москва, 2021), Международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (Москва, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 25 работ, в том числе 10 статей в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science, Scopus и в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 195 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, включает 18 таблиц и иллюстрирована 47 рисунками. Указатель литературы включает 164 источника, из которых 22 отечественных и 142 зарубежных. Диссертация содержит 2 приложения.

Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Постановка задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем и другими соавторами публикаций.

Благодарность

Автор выражает благодарность ведущему научному сотруднику лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» профессору, доктору биологических наук Владимиру Кимовичу Мазо за неоценимую помощь в организации и обсуждении результатов экспериментов *in vivo*.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика используемых материалов

Сухой экстракт листьев черники (ЭЛЧ, ООО «ХАРМС», Россия) представлял собой аморфный гигроскопичный порошок бурого цвета. Массовая доля влаги - 6,1%, золы – 16,8%. Содержание общих полифенолов 95,5±1,1 мг-экв. галловой к-ты/1г экстракта. *Ягоды черники* (ООО «Мир заморозки», Россия) были предварительно высушены на лиофильной сушке ЛС-500 (ООО «ПРОИНТЕХ», Россия). Влажность свежих ягод составила 81±0,8%. *Опытный образец гречневой муки* был получен измельчением промышленной партии муки (ООО «ХлебЗерноПродукт», Россия, г. Таганрог), с использованием ножевой мельницы GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия) при 8000 об/мин в течение 10 мин. Массовая доля белка в образце составила 9,7%, углеводов – 70,0%, золы - 1,6%, влажность – 5,5%. *Зерно черного киноа* (Nat-Food, Россия) предварительно размалывали на ножевой мельнице и просеивали через сито с диаметром пор 0,35 мм. *Коагулированный белок куриного яйца* получали согласно методу [Сидорова Ю.С. и др., 2018]. Содержание белка в коагуляте составляло 77%.

Получение концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1 – модельный). Процесс сорбции полифенолов из водных растворов экстракта листьев черники на гречневой муке (соотношение 15:1) вели при постоянном перемешивании смеси на магнитной мешалке в течение 1 часа при температуре 25°C и по окончании процесса проводили центрифугирование полученной суспензии (центрифуга Beckman J6B (AL-TAR, США)) при 4000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант отделяли от осадка методом декантирования. Осадок лиофильно высушивали с использованием установки ЛС-500 (ООО «ПРОИНТЕХ», Россия). Полученный концентрат полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, представлял собой мелкодисперсный порошок коричневого цвета.

Получение концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2). Навеску сухих ягод перемешивали с 75% этиловым спиртом в соотношении 1 г ягод/20 мл экстрагента в течение 1 часа при температуре 25°C с последующим центрифугированием при 4000 об/мин в течение 30 мин (центрифуга Beckman J-6B, США), отбирали супернатант и концентрировали на установке обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным «УРФ-1812» (Владисарт, РФ), после чего удаляли спирт на роторном испарителе. Процесс сорбции полифенолов экстракта ягод на измельченной гречневой муке вели при постоянном перемешивании смеси экстракта ягод и гречневой муки в соотношении 15:1 в течение 1 часа при температуре 25°C. Полученную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, супернатант отделяли от осадка декантированием, затем осадок лиофильно высушивали. Полученный концентрат полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, представлял собой мелкодисперсный порошок темно-фиолетового цвета.

Получение концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3). Экстракцию 20-гидроксиэкдизона (20E) в смеси с флавоноидами из размолотого (на ножевой мельнице при 8000 об/мин в течение 10 мин) и просеянного (через сито с диаметром пор 0,355 мм) зерна черного киноа вели при температуре 25°C в течение 1 часа, перемешивая 200 г размолотого и просеянного зерна с 4000 мл 40% раствора этанола. Смесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирали супернатант. Проводили ультрафильтрацию супернатанта через мембрану с диаметром пор 10 кДа на установке для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-018 (Владисарт, РФ). Полученный ультрафильтрат концентрировали на

установке для обратного осмоса (Владисарт, РФ). Этанол из полученного экстракта удаляли на роторном испарителе. Получение концентрата вели при постоянном перемешивании экстракта зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца при температуре 25°C в течение 1 часа в соотношении 1г белка/45мл экстракта с последующим лиофильным высушиванием. Полученный концентрат 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, представлял собой мелкодисперсный порошок светло-коричневого цвета.

Аналитические методы исследования

Гранулометрическую характеристику¹ опытных образцов гречневой муки и пищевого ингредиента 1 проводили методом электронно-сканирующей микроскопии [Petrov N.A. et al., 2018]. Содержание общих полифенолов в образцах определяли по методу Фолина-Чокальтеу [Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи, 2010]. Суммарное содержание антоцианинов в образцах оценивали рН-дифференциальным методом [Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи, 2010]. Определение суммарного содержания и профиля флавоноидов², профиля индивидуальных антоцианинов² проводили методом ВЭЖХ согласно [Жогова А. А. и др., 2014; Петров Н. А. и др., 2019; ГОСТ 32709-2014]. Состав и содержание углеводов определяли методом обращено-фазовой ВЭЖХ³. Содержание 20-гидроксиэкдизона⁴ определяли методом ВЭЖХ согласно [Yoo S.R. et al., 2017].

Экспериментальные животные

В экспериментах *in vivo* использовали молодых половозрелых мышей-самцов линии C57Bl/6 (145 животных, возраст 5 недель) и молодых половозрелых крыс-самцов стока линии Вистар (72 животных, возраст 5 недель). Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-60%, 12 часовой цикл освещения). Мыши содержались по 4 особи в клетке, крысы - по 2 особи. Животные на протяжении экспериментов получали питьевую воду (фильтруемую системой MilliRO) и корм *ad libitum*. Исследования на животных выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в Национальном стандарте РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ Р 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Моделирование нарушений углеводного и липидного обмена с использованием высокожирового высокоуглеводного рациона. Нарушения углеводного и липидного обмена моделировали путем кормления животных высокожировым высокоуглеводным рационом (ВЖВУ рационом) [Ishikawa A. et al., 2007; Bhandarkar N.S., 2019]. В состав ВЖВУ рациона входит 22,5% белка, 30% жира, 18% углеводов в виде крахмала и 20% сахарозы. Общая калорийность рациона составляет 493 ккал/100 г.

Моделирование стрессорного воздействия путем принудительной иммобилизации. Иммобилизационный стресс моделировали путем помещения животных в прозрачные домики-фиксаторы (ООО «Открытая наука», Россия), ограничивающие свободу движения [Sahin Z. et al., 2021]. В течение эксперимента животных каждый день помещали в домики и фиксировали в неподвижном состоянии в течение 40 минут. При проведении истощающей иммобилизации длительность фиксации составила 3 часа.

Моделирование стрессорного воздействия посредством истощающей физической нагрузки. Для моделирования стрессорного воздействия посредством истощающей физической

¹ Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Саркисяном В.А.

² Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории метаболомного и протеомного анализа к.фарм.н. Перовой И.Б.

³ Выполнено совместно с научным сотрудником лаборатории химии пищевых продуктов к.фарм.н. Боковым Д.О.

⁴ Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории химии пищевых продуктов к.фарм.н. Малинкиным А.Д.

нагрузки использовали беговую дорожку [Poole D.C. et al., 2020]. Истошающую физическую нагрузку проводили при следующих условиях: продолжительность нагрузки составляла 50 мин, скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна составлял 10°. Сразу после бега животных помещали в индивидуальные обменные клетки для сбора суточной мочи.

Физиологические методы исследования⁵

Исследовательскую активность и тревожность животных оценивали в тесте Открытое поле (ОП). Тревожность животных оценивали в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Краткосрочную и долгосрочную память животных оценивали в тесте Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Оценку статического компонента выносливости животных проводили измерением силы хватки передних лап с помощью динамометра (Bioseb, Германия).

Биохимические методы исследования⁵

Для прижизненного определения концентрации глюкозы в крови в течение эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены; уровень глюкозы определяли с помощью портативного электрохимического глюкометра («OneTouch Select», США). Для определения нарушения толерантности к глюкозе применяли пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). Для определения чувствительности тканей к инсулину проводили тест на инсулинорезистентность (ИРТ).

Содержание гликированного гемоглобина определяли спектрофотометрически с использованием коммерческого набора «Гликогемотест» (ЭЛТА, Россия). В плазме крови мышей ИФА «сэндвич»-методом определяли содержание лептина с использованием коммерческих наборов реактивов (RayBiotech, США и BioVendor, Чехия). Содержание грелина в плазме крови мышей ИФА конкурентным методом определяли с использованием коммерческого набора по инструкции производителя (RayBiotech, США). Содержание инсулина в плазме крови мышей определяли «сэндвич»-методом с использованием коммерческого набора реактивов (Alpco, США). Содержание триглицеридов (ТГ) и холестерина (ХС) в жире, экстрагированном из печени, определяли спектрофотометрически на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 20i (ThermoScientific, США)⁶. Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс определяли методом конкурентного ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (IDS limited, Великобритания). В сыворотке крови крыс на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab 20i» (Thermo Fisher Scientific, США) определяли содержание показателей белкового обмена (общий белок, мочевины, креатинин), липидного обмена (общий холестерин, холестерин ЛПВП, холестерин ЛПНП, триглицериды), пуринового обмена (мочевая кислота), минерального обмена (фосфор, магний, кальций), функционального состояния печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза) и уровень глюкозы. Содержание простагландина E2 в моче крыс определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (R&D systems, США). Содержание катехоламинов⁷ - норадреналина, адреналина и дофамина – в моче определяли методом ВЭЖХ.

Дизайны экспериментов in vivo

На первом этапе проводили эксперименты по сравнительной физиолого-биохимической оценке эффектов пищевых ингредиентов 1 и 2 - концентратов полифенолов листьев и ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона.

⁵ Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Сидоровой Ю.С.

⁶ Выполнено совместно с инженером-исследователем 1-й категории лаборатории метаболического и протеомного анализа к.м.н. Сото С.Х.

⁷ Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Зориным С.Н.

Таблица 1. Дизайны экспериментов *in vivo*

Группы	Рацион	Пищевой ингредиент/доза	Определяемые показатели
Эксперимент №1 (длительность 130 суток)			
К1 (n=10)	ПСР	-	Прижизненно: мониторинг потребления корма, прироста массы тела, уровня глюкозы крови, проведение тестов ПГТТ (39-е и 82-е сутки) и ИРТ (15-е, 45-е и 91-е сутки), оценка тревожности в тесте приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, 40-е и 90-е сутки), оценка памяти в тесте условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ, 49-е, 50-е и 70-е сутки). Выведение из эксперимента (130-е сутки) Биохимический анализ крови: гликированный гемоглобин, лептин, грелин. Определение триглицеридов и холестерина в печени.
К2 (n=12)	ВЖВУ	-	
Г3 (n=13)	ВЖВУ	Пищевой ингредиент 1 / 2,5 г/100 г рациона	
Г4 (n=13)	ВЖВУ	Пищевой ингредиент 1 / 5,0 г/100 г рациона	
Г5 (n=13) (с 60-х суток эксперимента)	ВЖВУ	Пищевой ингредиент 1 / 2,5 г/100 г рациона	
Эксперимент №2 (длительность 109 суток)			
К1 (n=28)	ПСР	-	Прижизненно: мониторинг потребления корма, прироста массы тела, уровня глюкозы крови, силы хватки передних лап, проведение тестов ПГТТ (50-е и 89-е сутки) и ИРТ (73-и и 107-е сутки), оценка тревожности в тесте ПКЛ (60-е и 101-е сутки), оценка памяти в тесте УРПИ (78-е, 79-е и 98-е сутки). Выведение из эксперимента (109-е сутки) Биохимический анализ крови: гликированный гемоглобин, лептин, грелин. Определение триглицеридов и холестерина в печени
К2 (n=28)	ВЖВУ	Гречневая мука / 0,75 г/кг массы тела	
Г3 (n=28)	ВЖВУ	Пищевой ингредиент 2 / 0,75 г/кг массы тела	

На следующем этапе проводили сравнительную физиолого-биохимическую оценку эффектов пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар в условиях принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки.

Таблица 2. Дизайны экспериментов *in vivo*

Группы	Рацион	Вид стресса	Пищевой ингредиент / доза	Определяемые показатели
Эксперимент №3 (длительность 37 суток)				
К1 (n=12)	ПСР	-	-	Прижизненно: мониторинг потребления корма, прироста
Г2 (n=12)	ПСР	Принудительная	-	

Г3 (n=12)	ПСП	иммобилизация (ежедневная 40 мин и истощающая иммобилизация на 36 сутки в течение 3 ч)	Пищевой ингредиент 3 / 0,6 г/100 г рациона	массы тела, оценка тревожности и исследовательской активности в тестах открытое поле (ОП, 22-е сутки) и ПКЛ (28-е сутки), оценка памяти в тесте УРПИ (14-е, 15-е и 29-е сутки). Выведение из эксперимента (37-е сутки). Биохимический анализ крови: кортикостерон, общий анализ крови. Биохимический анализ мочи: простагландин E2, катехоламины.
Эксперимент №4 (длительность 37 суток)				
К1 (n=12)	ПСП		-	Прижизненно: мониторинг потребления корма, прироста массы тела, оценка тревожности и исследовательской активности в тестах открытое поле (ОП, 22-е сутки) и ПКЛ (28-е сутки), оценка памяти в тесте УРПИ (14-е, 15-е и 29-е сутки). Выведение из эксперимента (37-е сутки). Биохимический анализ крови: кортикостерон, общий анализ крови. Биохимический анализ мочи: простагландин E2, катехоламины.
К2 (n=12)	ПСП	Истощающая	-	
Г3 (n=12)	ПСП	физическая нагрузка (на 36 сутки, скорость ленты 19-43 см/с, наклон полотна 10°, время 50 мин)	Пищевой ингредиент 3 / 0,6 г/100 г рациона	

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 23 и Microsoft Excel 2007. Вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены как M±m. Статистические различия между группами оценивали с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты исследований *in vitro*. Физико-химическая характеристика составов полученных пищевых ингредиентов

Максимальное содержание общих полифенолов в составе концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), определяемое их элюированием с носителя, составило 23,7±0,5 мг-экв. галловой кислоты (г.к.)/г муки. Суммарное содержание флавоноидов в полученном концентрате составило 1,37±0,1 мг/г. Содержание гидроксикоричных кислот в составе концентрата – 2,22±0,2 мг/г муки, проантоцианидинов – 0,45±0,04 мг/г муки, гидролизуемых танинов – 11,1±1,1 мг/г муки.

Содержание общих полифенолов в составе концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), составило 65,5±0,7 мг-экв. галловой кислоты/г муки. Среднее суммарное содержание антоцианинов в составе концентрата составило 27,3±2,7 мг/г муки. Среднее суммарное содержание флавоноидов в составе концентрата составило 1,2±0,1 мг/г. Суммарное содержание легкоусвояемых углеводов (глюкоза 11,9±1,1%, фруктоза 8,5±0,9%, сахароза 2,2±0,2%) в сухих ягодах составило более 20%. В составе

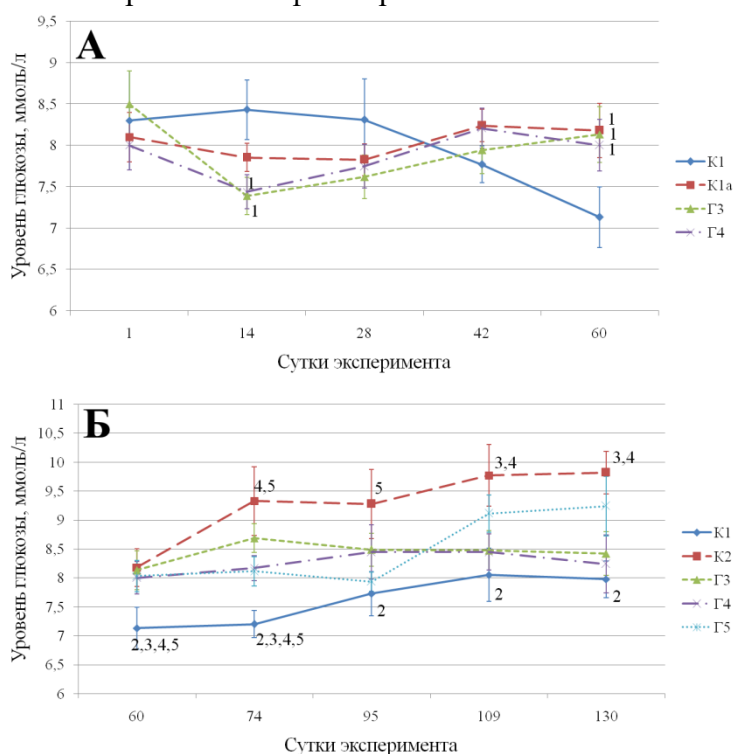
концентрата легкоусвояемые углеводы практически отсутствовали. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии сорбции моно- и дисахаридов из ягод черники на гречневой муке.

В размолотом зерне черного киноа содержание 20Е составило – $(0,16 \pm 0,02)$ мг/г зерна, содержание флавоноидов – $(0,27 \pm 0,03)$ мг/г зерна. Содержание 20Е в полученном концентрате составило $3,4 \pm 0,3$ мг/г, содержание флавоноидов – $14,1 \pm 1,4$ мг/г. Разработанная технологическая схема получения концентрата позволяет сконцентрировать фитостероиды более чем в 20 раз, а флавоноиды более чем в 50 раз по сравнению с исходным сырьем.

Результаты исследований *in vivo*

Эксперимент № 1. Влияние потребления концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), на нарушения углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированные ВЖВУ рационом

Мониторинг уровня глюкозы в крови животных проводился на всем протяжении эксперимента (рис. 1). Начиная с 60-х суток эксперимента и до его завершения, уровень глюкозы крови у животных контрольной «тучной» группы К2 был достоверно выше по сравнению с показателем животных контрольной группы К1, потреблявших стандартный рацион ($p < 0,05$). На 60-е и 74-е сутки эксперимента (рис. 1Б) концентрация глюкозы в крови животных опытных групп Г3 (получали пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5г/100г), Г4 (получали пищевой ингредиент 1 в количестве 5,0г/100г) и Г5 (получали пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5г/100г) также была статистически значимо выше по сравнению с соответствующим показателем для животных контрольной группы К1 ($p < 0,05$). Выявленное различие свидетельствовало о развитии гипергликемии к 8 неделе эксперимента на фоне приема животными ВЖВУ рациона.



Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой К2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3; 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4; 5 – различия достоверны по сравнению с группой Г5; ($p < 0,05$)

Рисунок 1. Изменение концентрации глюкозы крови, ммоль/л; А – 1-60-е сутки эксперимента; Б – 61-130-е сутки

При этом, на 74-е сутки эксперимента концентрация глюкозы в крови животных опытных групп Г4 и Г5 была также достоверно ниже показателя контрольной группы К2 ($p < 0,05$). На 95-е сутки эксперимента различие в уровне глюкозы в крови по сравнению с группой К2 было достоверным только для опытной группы Г5. Начиная с 109-х суток эксперимента и до его окончания, уровень глюкозы в крови животных групп Г3 и Г4 оставался достоверно ниже по

сравнению с контрольной группой К2 ($p < 0,05$), что говорит о выраженном гипогликемическом эффекте при потреблении пищевого ингредиента 1. Согласно [Kim Y. et al., 2016], полифенолы способны ингибировать активность α -амилазы слюны и α -глюкозидазы щеточной каймы тонкого кишечника, а также активность SGLT1 транспортера глюкозы, снижая таким образом поступление простых углеводов в организм. Помимо этого, полифенолы увеличивают чувствительность клеток к инсулину и повышают активность GLUT4 транспорта глюкозы посредством стимуляции сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и активации ферментов PI3K и 5'-аденозин монофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK) [Zhang Z.F. et al., 2010].

Начиная с 95-х суток эксперимента и до его окончания, не выявлено достоверных различий в уровне глюкозы крови животных группы Г5, начавших получать пищевой ингредиент 1 с 60-х суток эксперимента, по сравнению с обеими контрольными группами ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии ожидаемого эффекта потребления пищевого ингредиента при уже развившихся нарушениях углеводного обмена.

В первом тесте на глюкозотолерантность у животных всех групп, получавших ВЖВУ рацион, был отмечен рост площади под кривой (ППК), причем у животных групп К2 (933 ± 19 ммоль/л*180мин) и Г4 (984 ± 47 ммоль/л*180мин) увеличение было достоверным по сравнению с группой К1 (815 ± 35 ммоль/л*180мин). Во втором тесте показатель ППК не отличался статистически значимо от показателя ППК для животных группы К1 только для животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 1 в дозе 2,5 г/100 г рациона. Увеличение показателя ППК у животных групп, потреблявших ВЖВУ рацион, по сравнению с данным показателем у животных контрольной группы К1, указывало на развитие у этих животных состояния толерантности к глюкозе.

Показатель ППК в первом и втором тесте на инсулинорезистентность был наименьшим у животных группы Г4, получавших пищевой ингредиент в дозе 5,0 г/100 г рациона. Во время третьего тестирования у мышей всех опытных групп показатель ППК достоверно возрос по сравнению с контрольной группой К1 (496 ± 53 ммоль/л*180мин). Достоверное увеличение показателя ППК в третьем тесте у животных групп К2 (738 ± 57 ммоль/л*180мин) и Г3 (715 ± 57 ммоль/л*180мин) по сравнению с животными контрольной группы К1 ($p < 0,05$) свидетельствует о развитии резистентности к инсулину у этих животных. Потребление пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке, в количестве 5,0 г/100 г корма замедлило развитие этого состояния.

Не было выявлено достоверных различий в уровне тревожности и памяти между животными всех групп.

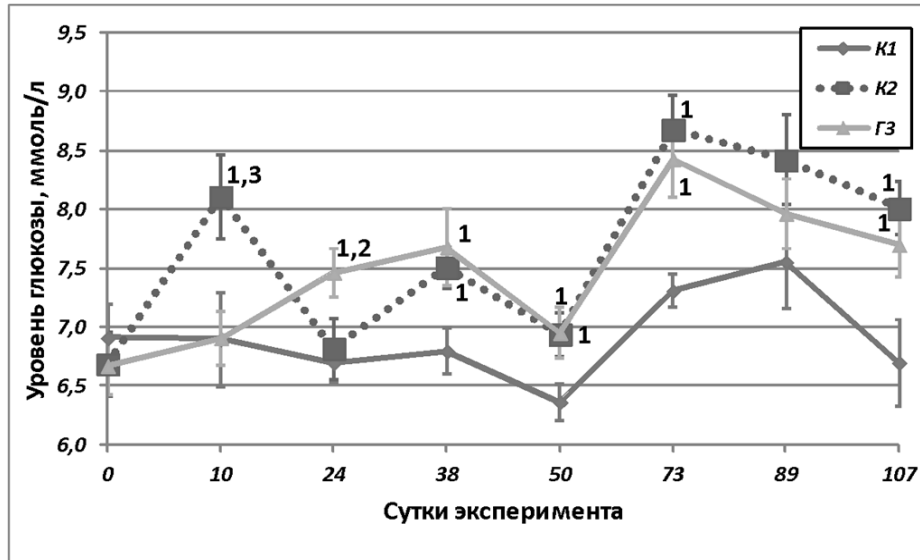
Достоверное увеличение уровня грелина в плазме крови животных группы Г4 ($80,5 \pm 15,9$ нг/мл) по сравнению с животными групп К1 ($1,8 \pm 0,2$ нг/мл) и К2 ($2,2 \pm 0,3$ нг/мл) указывает согласно [Panickar K.S. et al., 2013] на предотвращение избыточного набора массы тела при потреблении пищевого ингредиента 1. У мышей групп Г3 ($0,6 \pm 0,2$ нг/мл) и Г4 ($0,6 \pm 0,2$ нг/мл) по сравнению с мышами группы К2 ($1,6 \pm 0,3$ нг/мл) также были достоверно снижены уровни лептина, что свидетельствует согласно [Лещенко Д.В. и др., 2015] об уменьшении объемов жировой ткани у животных, получавших пищевой ингредиент.

Влияние потребления полифенолов на уровни лептина и грелина в крови исследовано в ряде работ. В частности, сочетанное потребление ресвератрола (50 мг/кг м.т./сутки) и кверцетина (0,95 мг/кг м.т./сутки) крысами-самцами линии Wistar с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными высокофруктозной диетой, способствовало достоверному снижению уровня лептина в крови этих животных по сравнению с животными, не получавшими полифенолы [Rubio-Ruiz M.E. et al., 2019]. Потребление экстракта картофеля *Solanum tuberosum* L. с высоким содержанием хлорогеновой и феруловой кислот способствовало росту уровня грелина у мышей линии C57Bl/6J на фоне потребления высокожирового рациона [Kubow S. et al., 2014]. В исследовании [Panickar K.S. et al., 2013] показано опосредованное влияние полифенолов на уровни лептина и грелина, что согласуется с результатом, полученным в нашем эксперименте.

Соответственно, можно предполагать, что потребление пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов, сорбированных на гречневой муке, приводило к нормализации липидного обмена путем регуляции уровней гормонов грелина и лептина.

Эксперимент № 2. Влияние потребления концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), на нарушения углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированные ВЖВУ рационом

На рисунке 2 представлены данные мониторинга уровня глюкозы на протяжении эксперимента.

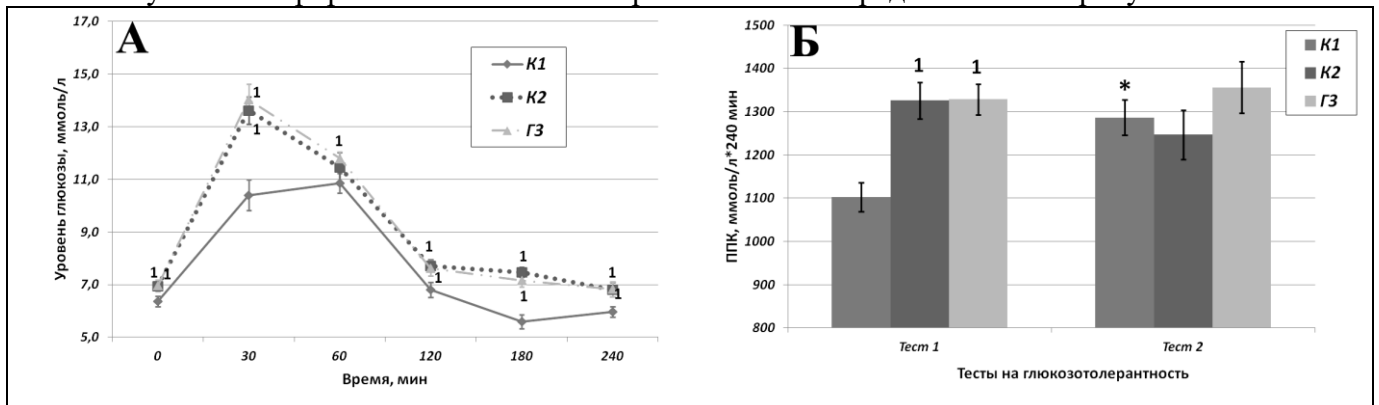


Примечание: 1 - различия достоверны по сравнению с группой K1 ($p < 0,05$); 2 – различия достоверны по сравнению с группой K2 ($p < 0,05$); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ($p < 0,05$).

Рисунок 2. Динамика уровня глюкозы животных, ммоль/л

На 10-е сутки эксперимента уровень глюкозы животных группы K2, получавших ВЖВУ рацион, был достоверно выше по сравнению с показателем животных групп K1, получавших полусинтетический рацион, и Г3, получавших ВЖВУ рацион с добавлением пищевого ингредиента 2. Начиная с 24-х суток у животных группы Г3 и с 38-х суток у животных группы K2, выявлено достоверное увеличение уровня глюкозы крови по сравнению с животными группы K1, которое оставалось достоверным до конца эксперимента. Выявленный результат свидетельствует о том, что потребление мышами линии C57Bl/6 ВЖВУ рациона приводит к развитию стойкой гипергликемии, без достоверного увеличения массы тела, по сравнению с животными контрольной группы. Введение в рацион животных пищевого ингредиента 2 на фоне ВЖВУ рациона не оказывало выраженных эффектов на уровень глюкозы крови.

Результаты перорального глюкозотолерантного теста представлены на рисунке 3.

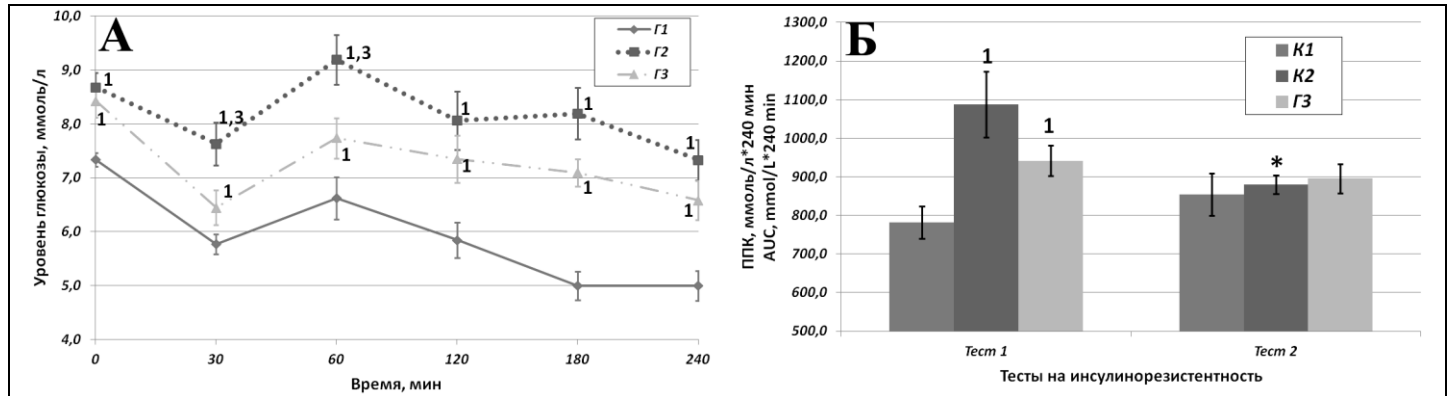


Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой K1 ($p < 0,05$); * различия достоверны по сравнению с тестом 1 ($p < 0,05$).

Рисунок 3. Результаты перорального глюкозотолерантного теста. А – динамика глюкозы в тесте на 50-е сутки эксперимента. Б – Площадь под кривой, ммоль/л*240 мин

По результатам первого тестирования на 50-е сутки эксперимента подтверждено развитие нарушений углеводного обмена у мышей линии C57Bl/6 на фоне ВЖВУ рациона. Уже к 30-й минуте теста уровень глюкозы крови животных обеих групп, получавших ВЖВУ рацион, поднялся до достоверно более высокого уровня по сравнению с контрольной группой К1, выше 13 ммоль/л, что говорит о развитии толерантности к глюкозе. На рисунке 3Б представлены результаты определения показателя ППК в глюкозотолерантном тесте на 50-е (1 тест) и на 89-е сутки эксперимента (2 тест). На 89-е сутки эксперимента показан достоверный рост показателя ППК для контрольной группы К1 по сравнению с первым тестированием, что привело к нивелированию разницы между сравниваемыми группами.

На рисунке 4 представлены результаты проведения теста на инсулинорезистентность.



Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ($p < 0,05$);

3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ($p < 0,05$); * – различия достоверны по сравнению с тестом №1 ($p < 0,05$).

Рисунок 4. Результаты инсулинорезистентного теста. А – динамика глюкозы в тесте на 73-е сутки эксперимента. Б – Площадь под кривой, ммоль/л*240 мин

На рисунке 4А видно, что у животных, получавших ВЖВУ рацион, после введения инсулина уровень глюкозы крови оставался достоверно выше по сравнению с животными контрольной группы К1 вплоть до 240-й минуты теста. Это говорит о развитии инсулинорезистентности, т.е. о снижении чувствительности тканей к действию экзогенного инсулина. Можно отметить, что на 30-й и 60-й минуте теста уровень глюкозы у животных опытной группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2, был достоверно ниже показателя для животных группы К2. На рисунке 4Б представлены результаты определения показателя ППК в инсулинорезистентном тесте на 73-и (1 тест) и на 107-е сутки эксперимента (2 тест). Показатель ППК на 73-и сутки эксперимента для групп К2 и Г3, получавших ВЖВУ рацион, также был достоверно выше по сравнению с показателем для животных контрольной группы К1. Заметна тенденция, как и в случае с результатами, представленными на графике рис. 4А, снижения показателя ИРТ для животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2. Во время второго тестирования на 107-е сутки эксперимента, несмотря на более высокий базовый уровень глюкозы крови животных групп К2 и Г3, показатель ППК достоверно не отличался между всеми группами.

Полученные в тестах ПГТТ и ИРТ результаты говорят о выраженном неблагоприятном влиянии потребления ВЖВУ рациона на толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность организма мышей линии C57Bl/6. Влияние пищевого ингредиента 2 показано в тесте на инсулинорезистентность, что может свидетельствовать о некотором сглаживании ответной реакции организма мышей на введение ВЖВУ рациона. На 73-и сутки в тесте ПГТТ и на 107-е сутки в тесте ИРТ не выявлено достоверных различий в уровне глюкозы крови и показателе ППК у всех групп животных.

При первом тестировании животных в тесте ПКЛ, проводимом на 60-е сутки кормления, не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям тревожности и общей активности. При вторичном тестировании на 101-е сутки кормления поведение животных изменилось. Животные группы К2 проводили достоверно меньше времени в открытых рукавах

лабиринта ($11,5 \pm 3,0$ с) и достоверно больше времени в закрытых рукавах лабиринта ($263,3 \pm 5,7$ с) по сравнению с первым тестированием ($35,6 \pm 3,0$ и $223,0 \pm 8,7$ с, соответственно). Мыши этой группы проводили достоверно меньше времени в открытых рукавах лабиринта также по сравнению с животными контрольной группы К1 ($30,9 \pm 9,2$ с). Это свидетельствует о повышенной тревожности животных контрольной группы К2, получавших ВЖВУ рацион, по сравнению с другими группами. Введение в рацион животных группы Г3 пищевого ингредиента 2 на фоне ВЖВУ рациона нивелировало отрицательный эффект ВЖВУ рациона до уровня контрольной группы К1 в тесте ПКЛ. Животные контрольной группы К1 ($247,4 \pm 10,6$ с) и опытной группы Г3 ($247,2 \pm 15,6$ с) проводили достоверно больше времени в закрытых рукавах по сравнению с первым тестированием ($215,9 \pm 10,3$ и $212,0 \pm 12,2$ с, соответственно). Достоверных различий во времени, проводимом в закрытых рукавах, между животными всех групп выявлено не было. Пройденная дистанция и количество переходов между зонами лабиринта достоверно не различались между животными всех групп, но были достоверно ниже по сравнению с первым тестированием.

Во время проведения первого теста УРПИ все животные групп К1 и Г3 входили в темный отсек камеры (100% выработка рефлекса). При этом в группе К2 было трое животных, которые не вошли в темный отсек (90% выработка рефлекса). Эти животные были исключены из дальнейшего тестирования. На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти статистически значимых различий по времени входа в темную камеру животных всех групп не выявлено. Через 3 недели при тестировании долгосрочной памяти также не выявлено значимых различий между группами. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии влияния пищевого ингредиента 2 на обучаемость и память животных в моделируемых условиях.

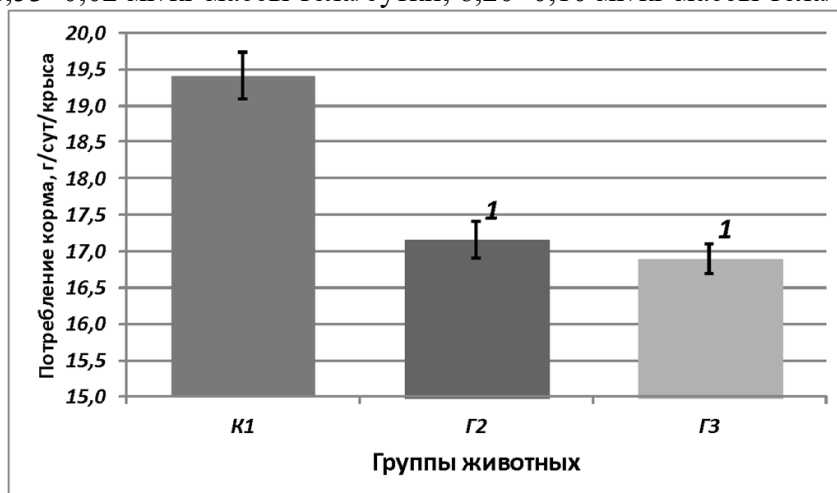
На 109 сутки животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом. Уровни гликированного гемоглобина в крови достоверно не различались между животными всех групп. Уровень инсулина плазмы крови животных опытной группы Г3 ($1,1 \pm 0,2$ нг/мл) был достоверно ниже по сравнению с показателем животных группы К2 ($1,6 \pm 0,2$ нг/мл) и не отличался достоверно от показателя животных контрольной группы К1 ($1,3 \pm 0,2$ нг/мл). Избыток жировой ткани провоцирует усиленную продукцию инсулина и гиперинсулинемию, что, в свою очередь, приводит к уменьшению количества рецепторов инсулина в периферических тканях и инсулинорезистентности, снижается уровень глюкозы крови, наступает чувство голода, в результате набор массы тела, ожирение [Zhang A.M.Y. et al., 2021]. Лептин, секретируемый адипоцитами белой жировой ткани, вызывает подавление аппетита. При ожирении, наряду с инсулинорезистентностью, развивается резистентность к лептину, поэтому измерение концентрации лептина может быть использовано для оценки риска развития этого заболевания. Кроме того, высокий уровень лептина создает высокую вероятность тромбоза [Pereira S. et al., 2021]. Уровень лептина в плазме крови животных группы К2 ($6,9 \pm 1,9$ пг/мл) был достоверно выше по сравнению с показателем контрольной группы К1 ($4,3 \pm 1,2$ пг/мл), что подтверждает развитие нарушений углеводного обмена у животных, получавших ВЖВУ рацион. Уровень лептина в плазме крови животных опытной группы Г3 ($5,8 \pm 1,6$ пг/мл), получавших пищевой ингредиент 2, достоверно не отличался от соответствующих показателей групп К1 и К2. Полученный нами результат согласуется с данными, представленными в работе [Logan I.E. et al., 2021], в которой у мышей линии Swiss Webster ожирение индуцировали высокожировой диетой. Было показано увеличение веса, повышение концентрации циркулирующего лептина и инсулина, накопление липидов в печени и нарушение толерантности к глюкозе. Потребление мышами-самцами линии Swiss Webster соединения полифенольной природы (ксантогумол) в дозе 60 мг/кг массы тела способствовало снижению уровня инсулина в крови. В работе тех же авторов [Miranda C.L. et al., 2016] полифенольное соединение ксантогумол снижало уровни как лептина, так и инсулина в крови мышей линии C57BL/6J, получавших высокожировой рацион по сравнению с тучным контролем. В работе [Xia H.M. et al., 2019] у крыс линии Sprague Dawley, получавших полифенолы зеленого чая на фоне высокожировой диеты, также показано снижение инсулина крови.

По показателям липидного обмена в печени – общему содержанию жира, содержанию холестерина и триглицеридов не выявлено достоверных различий между животными всех групп.

Таким образом, потребление пищевого ингредиента 2, по-видимому, сглаживало ответную реакцию организма на введение экзогенного инсулина на фоне потребления ВЖВУ рациона в инсулинорезистентном тесте. Полифенольные соединения в составе пищевого ингредиента способствуют регуляции уровней гормонов инсулина и лептина мышей линии C57Bl/6, оказывая положительное влияние на углеводный и липидный обмен экспериментальных животных. Отмечено снижение уровня тревожности животных, получавших пищевой ингредиент 2, по сравнению с группой животных, получавших только ВЖВУ рацион.

Эксперимент № 3. Влияние потребления концентрата 20-гидроксиэкидизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3), на показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар в условиях принудительной иммобилизации

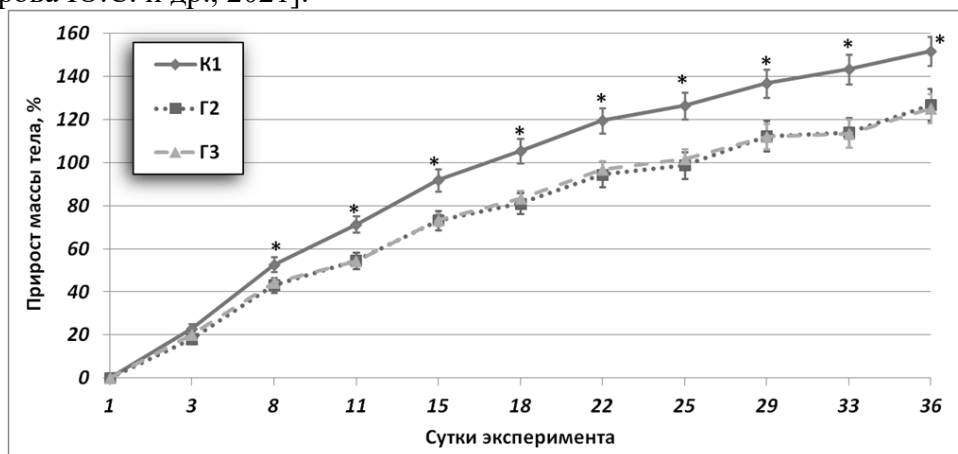
Среднее кумулятивное потребление корма (рис. 5) животными групп Г2 (подверженными иммобилизационному стрессу) и Г3 (получавшими пищевой ингредиент 3 на фоне иммобилизационного стресса) было достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с потреблением корма контрольными (интактными) животными группы К1. Расчетное (среднее) потребление 20Е и флавоноидов в составе пищевого ингредиента 3 животными опытной группы Г3 составило соответственно – $1,53 \pm 0,02$ мг/кг массы тела/сутки; $6,20 \pm 0,10$ мг/кг массы тела/сутки.



Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1.

Рисунок 5. Потребление корма животными, г/сут/крыса

Масса тела животных групп Г2 и Г3, подверженных хроническому иммобилизационному стрессу, начиная с 8-х суток эксперимента и до его окончания, была достоверно ($p < 0,01$) ниже массы тела животных группы К1. Иммобилизация является сильным стрессорным воздействием для крыс-самцов линии Вистар и приводит к достоверному отставанию в приросте массы тела (рис. 6) [Сидорова Ю.С. и др., 2021].



Примечание: * - различия достоверны по сравнению с группами Г2 и Г3 ($p < 0,01$).

Рисунок 6. Динамика массы тела животных, г

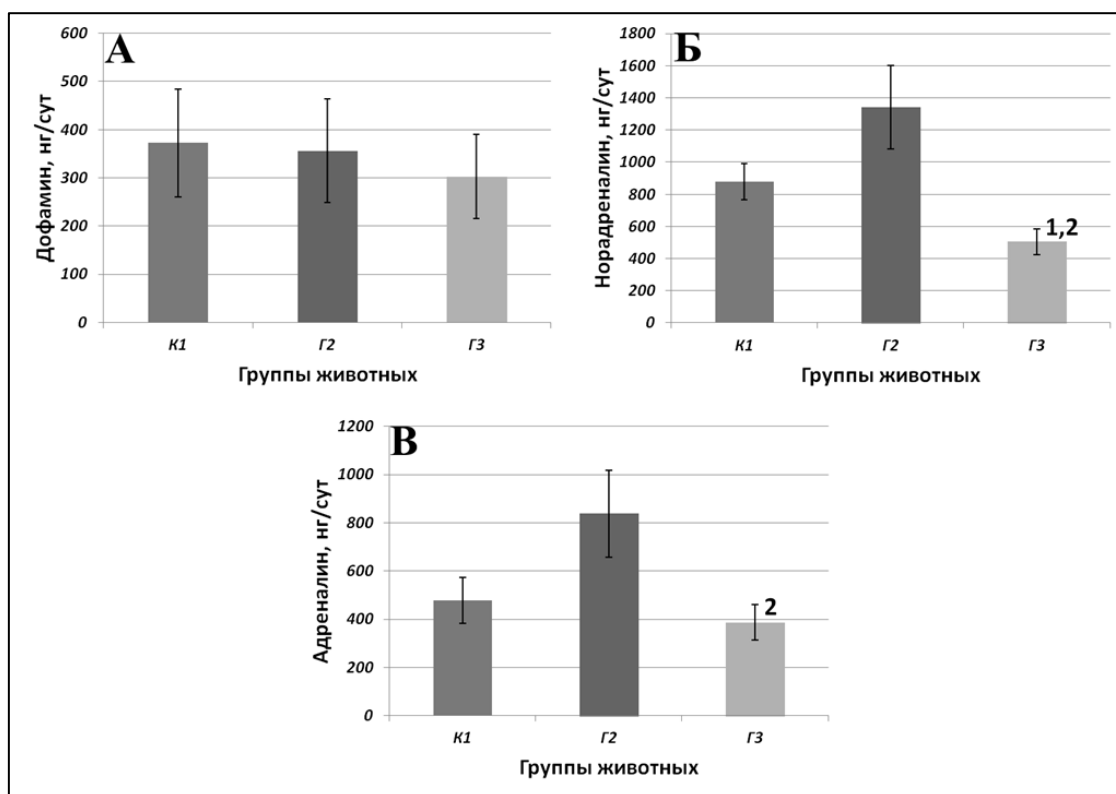
При первом тестировании на установке ПКЛ (0 сутки), не выявлено достоверных различий временных интервалов, проведенных животными всех групп, в открытых (ОР) и закрытых (ЗР) рукавах лабиринта (показатели, характеризующие тревожность животных); достоверных отличий в исследовательской активности, характеризуемой показателями перемещения между рукавами лабиринта и общей пройденной дистанцией, на начало эксперимента между животными сравниваемых групп также не выявлено. При вторичном тестировании на 28-е сутки кормления поведение животных изменилось. Животные группы К1 достоверно меньше времени проводили в ОР лабиринта ($17,1 \pm 5,7$ с) и достоверно больше в ЗР лабиринта ($259,0 \pm 5,6$ с) по сравнению с первым тестированием ($49,2 \pm 8,0$ и $225,3 \pm 9,5$ с, соответственно, $p < 0,05$), что согласуется с возрастными изменениями в поведении животных. При этом животные групп Г2 ($207,3 \pm 20,2$ с) и Г3 ($215,5 \pm 11,2$ с) проводили достоверно меньше времени в ЗР лабиринта по сравнению с животными группы К1 ($p < 0,05$). Животные группы Г3 ($43,5 \pm 8,3$ с) также проводили достоверно больше времени в открытых рукавах лабиринта. Аналогичный результат получен и для показателей исследовательской активности: количество переходов между рукавами лабиринта было достоверно больше у животных группы Г2 (27 ± 2) по сравнению с животными группы К1 (21 ± 1 , $p < 0,05$).

В тесте Открытое поле не было выявлено достоверных отличий поведения животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 3, по сравнению с животными группы К1. Установлено, что животные группы Г2 достоверно меньше времени проводили в центре лабиринта ($7,5 \pm 2,6$ с) и соответственно больше времени в зоне периферии по сравнению с контрольной группой К1 ($16,8 \pm 2,4$ с, $p < 0,05$), что свидетельствует о повышенной тревожности подвергавшихся иммобилизации животных. При этом животные данной группы достоверно больше перемещались по лабиринту ($1906,7 \pm 162,4$ см) по сравнению с животными группы К1 ($1330,6 \pm 197,5$ см, $p < 0,05$), что согласуется с результатами, полученными в тесте ПКЛ. Достоверных различий по показателям тревожности и исследовательской активности между животными группы Г2 и группы Г3, получавшими концентрат 3, выявлено не было.

Результаты эксперимента свидетельствуют, что потребление животными группы Г3 пищевого ингредиента 3 - концентрата 20Е и флавоноидов, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, нивелировало негативное влияние иммобилизационного стресса на тревожность животных.

Во время первого теста УРПИ все животные заходили в темный отсек установки (100% выработка рефлекса). На 2-е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий во времени латентного входа в темный отсек между группами не выявлено. На 14-е сутки тестирования долгосрочной памяти также не выявлено достоверных различий в латентном времени входа в темный отсек установки между животными всех групп. Потребление в составе рациона пищевого ингредиента 3 не оказало эффекта на краткосрочную и долгосрочную память животных.

На рисунке 7 представлены результаты определения суточной экскреции катехоламинов с мочой после истощающей 3-х часовой иммобилизации животных (36-е сутки эксперимента).



Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой K1; 2 - различия достоверны по сравнению с группой G2, $p < 0,05$.

Рисунок 7. Экскреция катехоламинов с мочой, нг/сутки

Не выявлено достоверных отличий суточной экскреции дофамина с мочой у животных всех групп. При этом суточная экскреция норадреналина и адреналина с мочой у животных группы Г3, получавших концентрат 3, была достоверно ниже по сравнению с животными группы Г2. Также у животных, потреблявших пищевой ингредиент 3, экскреция норадреналина с мочой была достоверно ниже по сравнению с животными группы К1.

Не выявлено достоверных отличий суточной экскреции простагландина E2 с мочой у животных всех групп (K1 – $20,1 \pm 2,0$ нг/сут; G2 – $19,3 \pm 3,3$ нг/сут; G3 – $16,9 \pm 2,1$ нг/сут).

Свидетельством стрессорного воздействия принудительной ежедневной иммобилизации явилось достоверное увеличение уровня кортикостерона в сыворотке крови у крыс группы Г2 ($48,3 \pm 10,5$ нг/мл) и Г3 ($46,0 \pm 9,7$ нг/мл) по сравнению с животными группы К1 ($19,2 \pm 4,4$ нг/мл, $p < 0,05$). Столкнувшись с острым стрессором, организм животного запускает активацию симпатической нервной системы и оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Эта активация приводит к высвобождению глюкокортикоидов, катехоламинов и цитокинов, которые взаимодействуют как часть сложной нелинейной сети и действуют как первичные медиаторы стрессовой реакции [Strahler J. et al., 2015; Mourtzi N. et al., 2021]. Нами было выявлено регулирующее влияние пищевого ингредиента 3 на симпатoadреналовую систему путем снижения уровней норадреналина и адреналина в моче животных группы Г3 в ответ на вызванное обездвиживанием повышение уровня кортикостерона в крови животных. Полученный результат говорит об определенном адаптогенном эффекте пищевого ингредиента 3, направленном на сглаживание ответной реакции организма на сильный стресс.

Анализ результатов биохимических показателей крови свидетельствует о том, что хроническая иммобилизация вызывала только достоверное увеличение уровня общего билирубина в крови животных группы Г2 ($6,07 \pm 0,50$ мкмоль/л) относительно животных группы К1 ($4,73 \pm 0,31$ мкмоль/л).

При этом в крови животных группы Г3 показан достоверный рост содержания ЛПВП ($0,97 \pm 0,04$ ммоль/л) и падение уровня ЛПНП ($0,18 \pm 0,01$ ммоль/л) и триглицеридов ($0,74 \pm 0,03$ ммоль/л) в отличие от животных группы К1 ($0,83 \pm 0,05$ ммоль/л; $0,23 \pm 0,02$ ммоль/л и $1,09 \pm 0,12$

ммоль/л соответственно), что указывает на гипополипидемический эффект потребления концентрата 3.

В крови животных группы Г3 показано достоверное повышение уровня АСТ ($255,6 \pm 18,6$ ед/л) по сравнению с животными групп К1 ($178,4 \pm 19,3$ ед/л) и Г2 ($136,2 \pm 23,0$ ед/л), а также повышение уровня АЛТ ($92,9 \pm 6,5$ ед/л) относительно животных группы К1 ($76,1 \pm 4,3$ ед/л). Увеличение активности АСТ обычно связано с повреждением печени или скелетных мышц [Bodie K. et al., 2016; Xu L. et al., 2018]. При повреждении печени возрастают уровни как АЛТ, так и АСТ, причем степень возрастания уровня АЛТ значительно выше по сравнению с АСТ. Соответственно, полученный нами результат не связан с токсичным действием концентрата на печень, так как не было показано роста АЛТ по сравнению с АСТ. Обездвиживание животных могло приводить к легкому повреждению мышц и, соответственно, повышать активность АСТ [Anthony T.G. et al., 2015].

Эксперимент № 4. Влияние концентрата 20-гидроксиэджизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3), на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке

Среднее кумулятивное потребление корма (рис. 8) животными всех групп достоверно не различалось. Расчетное среднее потребление 20Е в составе пищевого ингредиента 3 животными опытной группы Г3 составило – $1,81 \pm 0,02$ мг/кг массы тела/сутки; расчетное потребление флавоноидов – $8,6 \pm 0,1$ мг/кг массы тела/сутки.

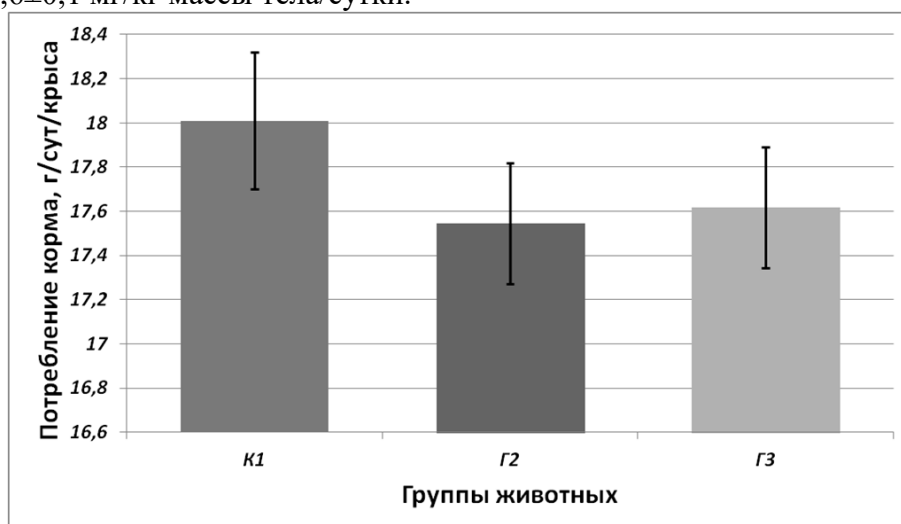


Рисунок 8. Потребление корма животными, г/сут/крыса

Прирост массы тела животных всех групп достоверно не отличался до 36-х суток эксперимента. На 36-е сутки эксперимента прирост массы тела животных группы Г3 (получавших пищевой ингредиент 3 с последующей истощающей физической нагрузкой) был достоверно ниже ($175,7 \pm 6,1\%$) по сравнению с интактными животными контрольной группы К1 ($200,1 \pm 9,1\%$) ($p < 0,05$).

При первом тестировании на установке ПКЛ (0 суток), не выявлено достоверных различий временных интервалов, проведенных животными всех групп в открытых (ОР) и закрытых (ЗР) рукавах лабиринта (показатели, характеризующие тревожность животных); достоверных отличий в исследовательской активности, характеризуемой показателями перемещения между рукавами лабиринта и общей пройденной дистанцией, на начало эксперимента между сравниваемыми группами также не выявлено.

При вторичном тестировании животные опытной группы Г2 достоверно меньше времени проводили в ОР ($31,5 \pm 6,8$ с), общая пройденная дистанция ($1229,6 \pm 107,2$ см) у них также была достоверно ниже по сравнению с первым тестированием ($52,3 \pm 6,2$ с и $1542,8 \pm 93,4$ см, соответственно). Полученный результат показывает, что еженедельные тренировки на беговой дорожке оказывали негативное влияние на поведение животных, усиливая тревожность и снижая

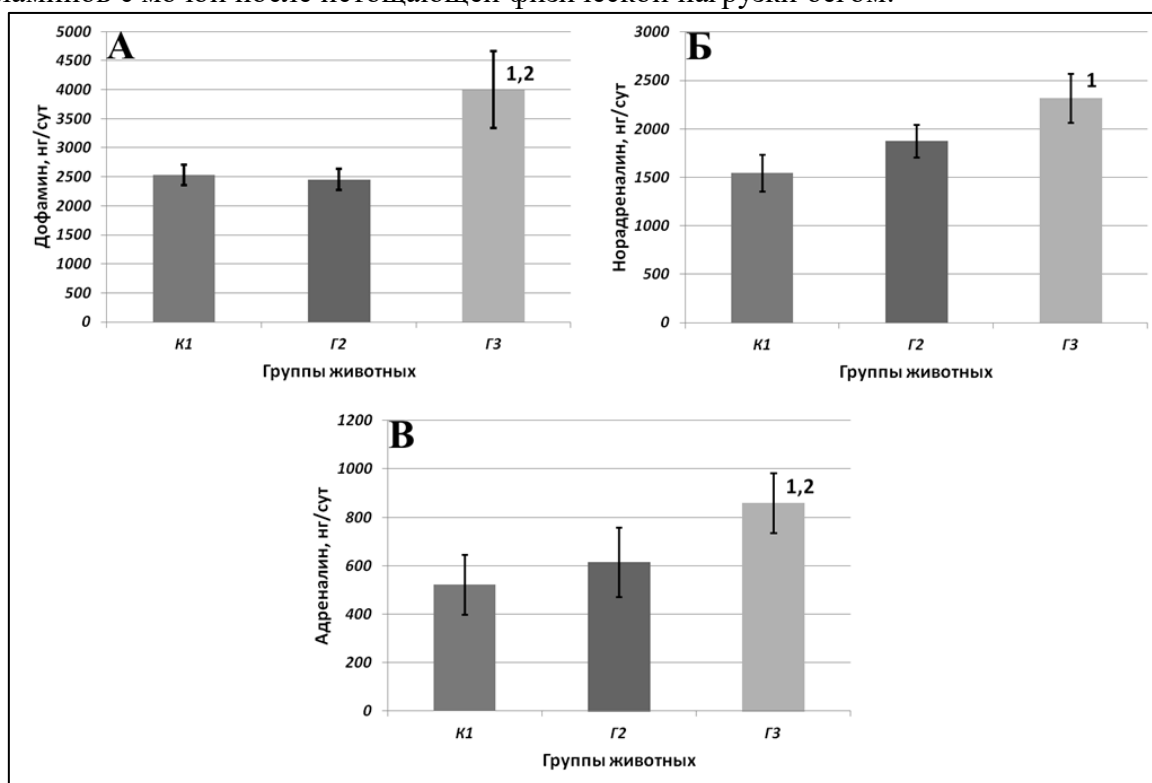
исследовательскую активность в лабиринте. При этом животные группы Г3, получавшие пищевой ингредиент 3, проводили достоверно больше времени в ОР ($60,4 \pm 11,7$ с) и достоверно меньше времени в ЗР лабиринта ($173,7 \pm 19,9$ с) в отличие от животных группы Г2 ($31,5 \pm 6,8$ и $227,3 \pm 10,8$ с, соответственно, $p < 0,05$).

По показателям тревожности в тесте Открытое поле выявлено, что животные группы Г2, подверженные еженедельным физическим упражнениям, достоверно меньше времени проводили в центре лабиринта ($14,6 \pm 3,0$ с) и, соответственно, больше времени в зоне периферии ($165,4 \pm 3,0$ с) по сравнению с животными группы К1 ($33,3 \pm 7,0$ и $146,7 \pm 7,0$ с, соответственно), что может свидетельствовать о повышенной тревожности животных этой группы. При этом животные группы Г2 достоверно больше перемещались по лабиринту ($1635,5 \pm 117,9$ см) по сравнению с животными контрольной группы К1 ($1209,1 \pm 133,6$ см). Достоверных отличий по всем показателям между опытной группой Г3 и контрольной группой К1 не выявлено.

Сочетанное использование двух физиологических тестов ПКЛ и ОП показало, что еженедельная физическая нагрузка повышает тревожность лабораторных животных. Введение в рацион пищевого ингредиента 3 нивелировало влияние регулярных беговых нагрузок на тревожность животных, оказывая выраженный анксиолитический эффект.

Во время первого теста УРПИ во всех группах присутствовали животные, не входившие в темный отсек камеры (от одного до двух) и исключенные из дальнейшего тестирования. На 2-е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами не выявлено. На 14-е сутки тестирования долгосрочной памяти латентное время входа в темный отсек камеры животными опытной группы Г2 (84 ± 25 с) было достоверно ниже по сравнению с контрольной группой К1 (152 ± 17 с), что может говорить о влиянии регулярных физических нагрузок на долгосрочную память крыс. Латентное время входа животными опытной группы Г3 достоверно не отличалось от аналогичного показателя у животных контрольной группы К1. Полученный результат свидетельствует об улучшении долгосрочной памяти у подверженных регулярным физическим нагрузкам животных, получавших пищевой ингредиент 3.

Далее, на рисунке 9 представлены результаты определения суточной экскреции катехоламинов с мочой после истощающей физической нагрузки бегом.

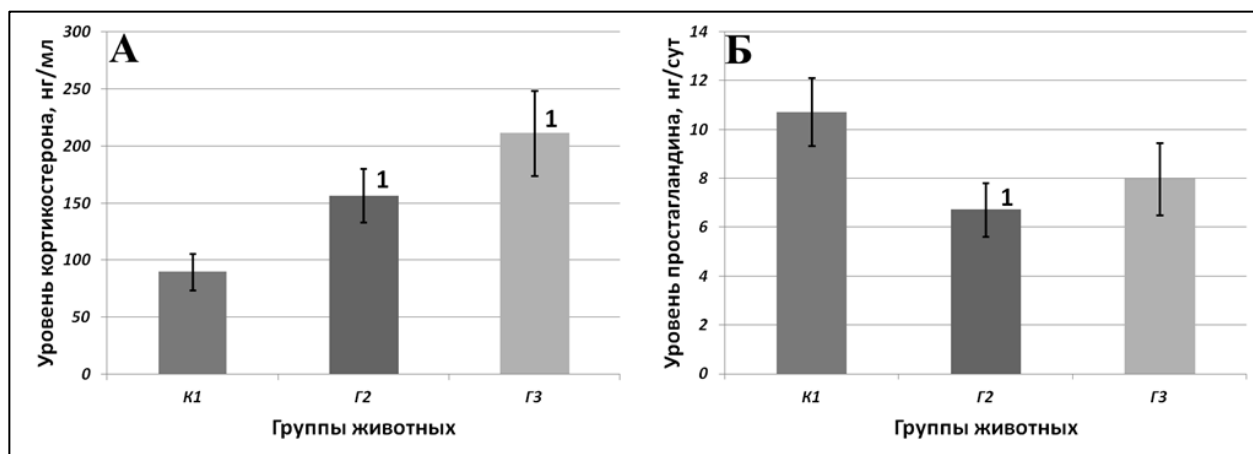


Примечание: 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ($p < 0,05$).

Рисунок 9. Экскреция катехоламинов с мочой, нг/сутки

Выявлено достоверное увеличение суточной экскреции дофамина и адреналина с мочой у животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 3 по сравнению с животными групп К1 и Г2. Также отмечено достоверное повышение экскреции норадреналина у животных группы Г3 по сравнению с животными группы К1.

На рисунке 10 представлены результаты определения уровня кортикостерона в сыворотке крови животных и суточной экскреции простагландина E2 с мочой животных после истощающей физической нагрузки.



Примечание: 1 - различия достоверны по сравнению с группой К1

Рис.10. Уровни кортикостерона (нг/мл, А) и простагландина (нг/сутки, Б)

Уровень кортикостерона в крови животных групп Г2 и Г3, подверженных истощающей физической нагрузке, был достоверно выше по сравнению с показателем животных группы К1. При этом суточная экскреция простагландина E2 с мочой животных группы Г2 достоверно снизилась по сравнению с аналогичным показателем для животных группы К1. Однако значения суточной экскреции простагландина E2 с мочой у животных групп К1 и Г3 достоверно не различались, что указывало на некоторое антистрессорное действие пищевого ингредиента 3.

Как уже отмечалось, стресс способствует увеличению выброса глюкокортикоидов за счет активности оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники, тогда как активация симпатической нервной системы приводит к повышению уровня катехоламинов. Когда один медиатор увеличивается или уменьшается в ответ на стресс, другие компенсируют его, пытаясь восстановить гомеостаз или стабильность физиологических систем, необходимых для поддержания жизни [Juster R.P. et al., 2009; McEwen B.S. et al., 2003].

Существует понятие состояния неспецифической сопротивляемости организма (СНПС), которое было определено еще в конце пятидесятых годов прошлого века отечественным ученым Н.В. Лазаревым как состояние организма, позволяющее ему «избежать» стадии истощения вследствие повышенной устойчивости организма к различным неблагоприятным воздействиям [Лазарев Н.В. и др., 1959]. СНПС оказывает регулирующее воздействие, оптимизирующее развитие ОАС, не являясь собственно фазой стресса. Состояние СНПС может быть достигнуто путем поступления в организм целого ряда различных соединений растительного, животного или искусственного происхождения - адаптогенов. Соответственно, можно предположить, что активные компоненты концентрата могут выступать в качестве адаптогенов, изменяя базовый уровень гомеостаза, повышая уровень катехоламинов в моче животных.

В крови животных группы Г3 отмечено достоверное снижение уровня триглицеридов ($0,81 \pm 0,08$ ммоль/л) по сравнению с животными групп К1 ($1,27 \pm 0,16$ ммоль/л) и Г2 ($1,08 \pm 0,11$ ммоль/л), что может говорить об определенном гиполипидемическом эффекте пищевого ингредиента 3.

У животных групп Г2 и Г3, подвергавшихся истощающей физической нагрузке, отмечено достоверное снижение уровня мочевой кислоты ($106,9 \pm 10,8$ и $105,2 \pm 7,4$ ммоль/л, соответственно) в крови по сравнению с животными контрольной группы К1 ($132,6 \pm 9,5$ ммоль/л).

В крови животных группы Г3 отмечено достоверное увеличение уровня АСТ ($243,7 \pm 19,4$ ед/л) по сравнению с показателем у животных групп К1 ($185,4 \pm 24,6$ ед/л) и Г2 ($175,9 \pm 13,5$ ед/л), что согласуется с данными предыдущего эксперимента № 3, и достоверное снижение уровня щелочной фосфатазы ($179,8 \pm 14,4$ ед/л) по сравнению с группой Г2 ($245,9 \pm 28,6$ ед/л).

Нами было выявлено достоверное повышение уровня катехоламинов в моче животных, потреблявших пищевой ингредиент 3, на фоне истощающей физической нагрузки, тогда как в предыдущем эксперименте, наоборот, показано достоверное снижение экскреции катехоламинов в ответ на обездвиживание. Соответственно, действие адаптогенов может зависеть от конкретной природы стрессора, по-разному активируя системы гипоталамус-гипофиз-надпочечник и симпатoadреналовую ось.

ВЫВОДЫ

1. С использованием комплекса физико-химических методов препаративного выделения и концентрирования, включающих экстракцию, мембранные технологии, измельчение, коагуляцию, сорбцию, получены три новых пищевых ингредиента - концентраты полифенолов листьев или ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, и концентрат полифенолов и 20-гидроксиэкидизона зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца. Количественно охарактеризован химический состав полученных пищевых ингредиентов и проведена физиолого-биохимическая оценка гипогликемических, гиполипидемических и антистрессорных свойств в опытах *in vivo* на лабораторных грызунах.

2. Определены оптимальные условия сорбции полифенолов листьев черники на измельченной гречневой муке (рН смеси, соотношение компонентов, температура, продолжительность процесса сорбции). В составе полученного пищевого ингредиента количественно охарактеризован профиль сорбированных индивидуальных полифенолов и определено их общее содержание, составляющее $23,7 \pm 0,5$ мг-экв. галловой кислоты/г муки.

3. Получен пищевой ингредиент - концентрат полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, в условиях, позволивших исключить сорбцию на муке простых углеводов: соотношение компонентов 1г муки/15мл экстракта, температура смеси 25°C , время сорбции 60 минут. Общее содержание полифенолов в составе пищевого ингредиента составило $65,5 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/г муки, антоцианов – $27,3 \pm 2,7$ мг/г муки, флавоноидов – $1,2 \pm 0,1$ мг/г муки.

4. Водно-спиртовой экстракцией 20-гидроксиэкидизона и флавоноидов зерна черного киноа, их последующим концентрированием с помощью мембранной технологии и сорбцией на коагулированном белке куриного яйца получен пищевой ингредиент, в котором содержание 20-гидроксиэкидизона и общее содержание флавоноидов составили соответственно $3,4 \pm 0,3$ мг/г и $14,1 \pm 1,4$ мг/г концентрата. Использованный технологический подход позволил сконцентрировать 20-гидроксиэкидизон и флавоноиды в составе концентрата более чем в 20 и 50 раз соответственно по сравнению с их исходным содержанием в зерне.

5. Разработаны и верифицированы две модели стрессорного воздействия на крыс-самцов линии Вистар: модель принудительной иммобилизации (ежедневная 40 минутная в течение 35 суток и однократная 3-часовая иммобилизация в последний день эксперимента) и модель истощающей физической нагрузки на беговой дорожке в течение 50 минут. Применимость обеих моделей для тестирования *in vivo* антистрессорных свойств биологически активных веществ подтверждается, во-первых, достоверным отставанием в приросте массы тела животных при принудительной иммобилизации и, во-вторых, достоверным повышением уровня в крови основного активатора стресса кортикостерона (в 2,5 раза при принудительной иммобилизации и в 1,7 раза при истощающей физической нагрузке).

6. Потребление на протяжении 130 суток пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (120 мг-экв. галловой кислоты/ кг массы тела), молодыми половозрелыми мышами-самцами линии С57В1/6 с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными ВЖВУ рационом, оказывало достоверное ($p < 0,05$) гипогликемическое и гиполипидемическое действие, снижая уровень глюкозы крови в 1,2 раза, снижая развитие инсулинорезистентности на 24,3%, а также снижая в

2,7 раза уровень лептина и повышая в 36,6 раз уровень грелина в крови этих животных (относительно животных группы сравнения).

7. Потребление в течение 109 суток пищевого ингредиента 2 - концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (60 мг-экв. галловой кислоты/кг массы тела), молодыми половозрелыми мышами-самцами линии С57В1/6 с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными ВЖВУ рационом, также оказало достоверное ($p < 0,05$) гипогликемическое и гипополипидемическое действие, снижая развитие инсулинорезистентности на 5,7% и снижая в крови животных уровни инсулина и лептина в 1,4 и 1,2 раза соответственно (относительно животных группы сравнения). Потребление пищевого ингредиента оказывало также достоверное ($p < 0,05$) анксиолитическое действие, снижая в 2,2 раза тревожность животных, определяемую в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

8. Потребление на протяжении 35 суток пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (0,5 г концентрата/кг массы тела), молодыми крысами-самцами линии Вистар, подверженными принудительной иммобилизации, достоверно ($p < 0,05$) снижало суточную экскрецию норадреналина и адреналина с мочой соответственно в 2,6 и 2,2 раза, не влияя на массу тела и уровень кортикостерона (относительно животных группы сравнения). Потребление пищевого ингредиента также достоверно ($p < 0,05$) оказывало гипополипидемическое действие, повышая в крови уровень ЛПВП в 1,2 раза, снижая уровни ЛПНП и триглицеридов в 1,3 раза и 1,5 раза соответственно.

9. Потребление на протяжении 35 суток пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (0,5 г концентрата/кг массы тела), молодыми крысами-самцами линии Вистар не влияло на содержание в их крови кортикостерона, значительно снижало в 1,6 раза уровень триглицеридов и после однократной истощающей беговой нагрузки достоверно ($p < 0,05$) повышало суточную экскрецию с мочой дофамина в 1,6 раза и адреналина в 1,4 раза относительно животных группы сравнения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, рецензируемых в базах данных Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК РФ

1. Мазо В.К., Петров Н.А., Саркисян В.А., Кочеткова А.А. Взаимодействие полифенолов пищи с белками: перспективы диетотерапии метаболического синдрома и сахарного диабета 2-го типа // Проблемы эндокринологии. – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 252-257.

2. Petrov N.A., Sidorova Yu.S., Sarkisyan V.A., Frolova Yu.V., Zorin S.N., Kochetkova A.A., Mazo V.K. Complex of polyphenols sorbed on buckwheat flour as a functional food ingredient // Foods and Raw Materials. – 2018. – V. 6, N 2. – P. 334-341.

3. Сидорова Ю.С., Шипелин В.А., Петров Н.А., Фролова Ю.В., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Экспериментальная оценка *in vivo* гипогликемических свойств функционального пищевого ингредиента – полифенольной пищевой матрицы // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87, № 4. – С. 6-14.

4. Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Шипелин В.А., Зорин С.Н., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Влияние полифенолов листьев черники на степень тревожности, пространственное обучение и память у мышей линии db/db // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88, № 3. – С. 53-62.

5. Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Перова И.Б., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Комплекс полифенолов черники, сорбированных на гречневой муке, как функциональный пищевой ингредиент // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88, № 6. – С. 68-72.

6. Zorin S.N., Mazo V.K., Petrov N.A., Vorobiova I.S., Sidorova Yu.S. Plant-based functional food ingredients: zinc, chromium and bilberry polyphenols complexes // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. – 2021. – V. 640. – P. 022091.

7. Petrov N.A., Biryulina N.A., Sidorova Yu.S., Mazo V.K. A food ingredient containing phytoecdysteroids and polyphenols from quinoa grain: technology and physiological and biochemical evaluation in vivo // E3S Web of Conferences. – 2021. – V. 285. – P. 05014.

8. Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Зорин С.Н., Мазо В.К. Влияние истощающей физической нагрузки или принудительной иммобилизации на физиологическое состояние и основные биохимические маркеры метаболизма и стресса крыс-самцов Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 171, № 3. – С. 290-295.

9. Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Зорин С.Н., Бирюлина Н.А., Мазо В.К. Физиолого-биохимическая оценка эффективности нового пищевого ингредиента: источника фитостероидов и флавоноидов из зерна киноа // Биотехнология. – 2021. – Т. 37, № 5. – С. 88-95.

10. Сидорова Ю.С., Петров Н.А., Бирюлина Н.А., Перова И.Б., Зорин С.Н., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Физиолого-биохимическая оценка эффективности нового пищевого ингредиента - концентрата полифенолов ягод черники // Вопросы питания. 2022. Т. 91, № 5. С. 43-55. DOI: <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-5-43-55>.

в других изданиях

11. Sarkisyan V.A., Frolova Y.V., Petrov N.A., Vorobieva I.S., Kochetkova A.A. Buckwheat flour as a matrix for sorption of plant phenolics: homology modeling, molecular docking, and FTIR study // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2019. – V. 10, № 1. – С. 1527-1536.

12. Petrov N.A., Sidorova Yu.S., Kochetkova A.A., Mazo V.K. Hypoglycemic Effects of Polyphenol Complexes from Bilberry Leaves and Fruits Sorbed on Brown Buckwheat Flour - Experimental Evaluation and Prospects of Use // 8th Scientific and Practical Conference "Biotechnology: Science and Practice", KnE Life Sciences. – 2021. – P. 1–12.

в материалах научных конференций

13. Петров Н.А., Мазо В.К., Шарафетдинов Х.Х. Повышение биодоступности полифенолов: профилактика сахарного диабета (краткий обзор) // В сборнике: Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии Материалы Международной конференции. Под редакцией Е.Л. Глоризова. 2017. С. 68-73.

14. Петров Н.А., Семин М.О. Разработка методики получения комплекса полифенолов экстракта листьев черники, сорбированных на белковом матриксе // В сборнике: Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи. Материалы Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием. 2017. С. 97-101.

15. Kiseleva T.L., Tutelyan V.A., Kochetkova A.A., Sidorova Yu.S., Sarkisyan V.A., Shipelin V.A., Petrov N.A., Zorin S.N., Mazo V.K. Plant sources of phytonutrients for specialized food products of antidiabetic action // Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ЦНИЛ СибГМУ (1-3 ноября 2017 г., Томск, Россия) / под ред. А.Г. Першиной – Томск: Изд-во СибГМУ, 2017. –с.50.

16. Мазо В. К., Петров Н. А., Саркисян В. А., Сидорова Ю. С., Киселева Т. Л., Кочеткова А. А. Доклиническая оценка гипогликемических и гиполипидемических свойств экстракта листьев черники и получение новой полифенольной пищевой матрицы - функционального пищевого ингредиента специализированных пищевых продуктов // Проблемы гигиенической донозологической диагностики и первичной профилактики заболеваний в современных условиях. Под общей редакцией доктора медицинских наук, профессора Захарченко М. П. — СПб.: Крисмас+, 2017. —310 с.

17. Петров Н.А., Фролова Ю.В., Мазо В.К. Комплекс полифенолов экстракта листьев черники с гречневой мукой: экспериментальная оценка in vitro и in vivo // В сборнике: Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии Сборник статей II Белорусского биохимического конгресса (г. Гродно, 17-18 мая 2018 г.). Под общей редакцией И.Н. Семенени и А.Г. Мойсеенка. 2018. С. 468-475.

18. Петров Н.А., Зорин С.Н., Хромченкова Е.П., Воробьева В.М., Мазо В.К. Получение функционального пищевого ингредиента на основе экстракта листьев черники и гречневой муки // Вопросы питания. 2018. Т. 87. № S5. С. 62.

19. Мазо В.К., Петров Н.А., Кочеткова А.А. Перспективы повышения эффективности использования полифенолов пищи в профилактике алиментарно-зависимых заболеваний // В сборнике: FOODLIFE 2018. Генетические ресурсы растений и здоровое питание: потенциал зерновых культур Материалы конференции. 2018. С. 60-61.

20. Петров Н.А., Зорин С.Н., Володин В.В., Володина С.О., Киселева Т.Л., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Функциональные пищевые ингредиенты, обогащенные полифенолами и/или экидистероидами // В сборнике: Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии Материалы Международной конференции. Весенняя сессия. Под редакцией проф. Е.Л. Глориозова. 2018. С. 101-106.

21. Петров Н.А., Сидорова Ю.С. Физиолого-биохимическая оценка *in vivo* нового функционального пищевого ингредиента, обогащенного полифенолами // В сборнике: Актуальные вопросы создания функциональных продуктов птицеводства и других отраслей пищевой промышленности Сборник трудов научной конференции. Под редакцией И.В. Мокшанцевой. 2018. С. 134-139.

22. Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Шипелин В.А. Моделирование стресса *in vivo* для оценки эффективности действия адаптогенов // В сборнике: Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний сборник материалов школы молодых ученых. 2019. С. 84-87.

23. Петров Н.А., Зорин С.Н., Бирюлина Н.А., Сидорова Ю.С. Физиолого-биохимическая оценка эффективности нового пищевого ингредиента: источника фитоэкидистероидов и флавоноидов из зерна киноа // В книге: Биотехнология: состояние и перспективы развития. материалы международного конгресса. Москва, 2021. С. 312-314.

24. Петров Н.А., Сидорова Ю.С., Кочеткова А.А., Мазо В.К. Получение и оценка *in vivo* комплексов биологически активных соединений с биополимерными матрицами // В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. Москва, 2021. С. 216-222.

25. Кочеткова А.А., Петров Н.А., Воробьева В.М., Воробьева И.С., Бирюлина Н.А., Зорин С.Н., Мазо В.К. Специализированный пищевой продукт гипогликемического и гипохолестеринемического действия: технология, характеристика состава // В сборнике: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Материалы Международной конференции. Москва, 2021. С. 169-173.