

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и
безопасности пищи

На правах рукописи

Петров Никита Александрович

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

1.5.4 – Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Член-корреспондент РАН,
доктор технических наук,
профессор,
Кочеткова Алла Алексеевна

Москва, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1 Общая характеристика полифенольных соединений: классификация, структура, биологические свойства	18
1.1.1 Биологические свойства полифенольных соединений	21
1.2 Полифенолы листьев и плодов черники	25
1.3 Метаболизм полифенолов в желудочно-кишечном тракте	30
1.4 Технологические подходы к повышению эффективности полифенольных соединений	32
1.5 Биологически активные вещества зерна черного киноа	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
2.1 Характеристика используемых материалов	43
2.2 Аналитические методы исследования	44
2.2.1 Гранулометрическая характеристика опытного образца гречневой муки	44
2.2.2 Определение содержания общих полифенолов	44
2.2.3 Определение суммарного содержания флавоноидов	45
2.2.4 Определение профиля флавоноидов	46
2.2.5 Определение суммарного содержания антоцианинов	47
2.2.6 Определение профиля индивидуальных антоцианинов	47
2.2.7 Определение состава и содержания углеводов	48
2.2.8 Определение содержания 20-гидроксиэкдизона	49
2.3. Препаративное получение и характеристика объектов исследования ...	50
2.3.1 Получение концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1)	50
2.3.2 Получение концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2)	51
2.3.3 Получение концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3)	52

2.4 Экспериментальные животные.....	53
2.5 Биохимические методы исследования.....	54
2.5.1 Определение концентрации гликированного гемоглобина в крови мышей	54
2.5.2 Определение концентрации лептина в крови мышей.....	54
2.5.3 Определение концентрации грелина в крови мышей	55
2.5.4 Определение концентрации инсулина в крови мышей	56
2.5.5 Определение показателей липидного обмена в печени мышей	56
2.5.6 Определение концентрации кортикостерона в крови крыс	57
2.5.7 Общий биохимический анализ крови крыс	57
2.5.8 Определение концентрации простагландина E2 в моче крыс	58
2.5.9 Определение уровня катехоламинов в моче крыс.....	58
2.6 Физиологические методы исследования	59
2.6.1 Измерение уровня глюкозы крови	59
2.6.2 Определение нарушения толерантности к глюкозе в пероральном глюкозотолерантном тесте.....	59
2.6.3 Определение чувствительности тканей к инсулину в тесте на инсулинорезистентность	60
2.6.4 Оценка общей двигательной активности, исследовательского поведения и эмоциональности в тесте Открытое поле	60
2.6.5 Оценка уровня тревожности в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт.....	61
2.6.6 Оценка краткосрочной и долгосрочной памяти в тесте Условный рефлекс пассивного избегания	62
2.6.7 Оценка статического компонента выносливости в тесте Сила хватки	64
2.7 Биологические модели.....	64
2.7.1 Моделирование нарушений углеводного и липидного обмена с использованием высокожирового высокоуглеводного рациона	64
2.7.2 Моделирование стрессорного воздействия путем принудительной иммобилизации	66
2.7.3 Моделирование стрессорного воздействия посредством истощающей физической нагрузки.....	66

2.8	Дизайны экспериментов <i>in vivo</i>	68
2.8.1	Эксперимент 1. Сравнительная физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона.....	68
2.8.2	Эксперимент 2. Изучение и физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона.....	72
2.8.3	Эксперимент 3. Проведение сравнительной физиолого-биохимической оценки эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона 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 в условиях принудительной иммобилизации	74
2.8.4	Эксперимент 4. Оценка <i>in vivo</i> биологических эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца (пищевой инеградиент 3) на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке...	76
2.9	Статистическая обработка данных.....	77
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ		78
3.1	Гранулометрическая характеристика опытного образца гречневой муки	78
3.2	Определение оптимальных условий сорбции полифенолов на гречневой муке.....	79
3.3	Характеристика пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке.....	81
3.4	Характеристика пищевого ингредиента 2 - концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке	85
3.5	Характеристика пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца	89

3.6 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона.....	91
3.7 Изучение и физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона.....	101
3.8 Проведение сравнительной физиолого-биохимической оценки эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона 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 в условиях принудительной иммобилизации	114
3.9 Оценка in vivo биологических эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца (пищевой ингредиент 3) на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке.....	122
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
5 ВЫВОДЫ	141
6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144
ПРИЛОЖЕНИЕ А. Лабораторный регламент получения концентрата полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке.....	166
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Лабораторный регламент получения концентрата флавоноидов и фитоэкдистероидов, экстрагированных из зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца.....	181

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно современным представлениям нутрициологии, оптимальное питание направлено на обеспечение человека необходимым количеством энергии и набором пищевых веществ природного (растительного и животного) происхождения в виде как традиционных пищевых продуктов, так и обогащенных биологически активными веществами (в том числе, минорными) с учетом возраста, пола и образа жизни для сохранения физического и психического здоровья и адекватной адаптации к факторам внешней среды, как отдельного человека, так и популяции в целом. Достижения в области фундаментальных физиолого-биохимических и эпидемиологических исследований и развитие новых научных дисциплин: нутригеномики, протеомики и метаболомики позволили ввести понятие «Нутриом», представляющее и конкретизирующее формулу оптимального питания [22]. Научно-практической аппликацией нутриома является возможное расширение списка минорных биологически активных веществ (БАВ) пищи, для которых получены убедительные свидетельства их участия в метаболизме. С позиций доказательной медицины установлено, что при дефиците или недостаточной обеспеченности этими БАВ имеют место снижение резистентности организма человека к неблагоприятным факторам окружающей среды (феномен маладаптации), формирование иммунодефицитных состояний, нарушение функции систем антиоксидантной защиты, хронизация болезней, повышение риска развития распространенных алиментарно-зависимых заболеваний, снижение качества жизни и эффективности лечебных мероприятий.

Растительные полифенолы и фитоэкдистероиды (полигидроксилированные стерины, представляющие собой структурные аналоги гормонов линьки и метаморфоз членистоногих), являются минорными 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 [36]. Это взаимодействие, зависящее от способности полифенолов проникать через фосфолипидный бислой и локализоваться в мембране, сказывается на фазовом состоянии липидов мембраны и её структурной организации [65]. В клеточной цитоплазме полифенолы могут воздействовать на активность различных ферментов и влиять на экспрессию ядерных и цитоплазматических белков и участвовать в сигнальных системах клетки [92, 105].

Широкий спектр биологической активности, проявляемый одним из наиболее изученных фитоэкдистероидов - 20-гидроксиэкдизоном, в настоящее время находит объяснение на примере участия этого соединения в PI3K 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 сходных с ним глюкокортикостероидов.

Согласно вышеизложенному, представляется перспективным включение растительных полифенолов и фитоэкдистероидов в составы специализированных пищевых продуктов для профилактики и/или коррекции нарушений углеводного и липидного обмена и специализированных пищевых продуктов с адаптогенными свойствами, что требует, во-первых, целенаправленного извлечения этих соединений из растительного сырья и, во-вторых, комплексирования с соответствующими пищевыми матрицами. Взаимодействие (комплексирование) с пищевой матрицей, основой которой являются биополимеры разной природы, априори может влиять на биологическую активность извлеченных и сконцентрированных минорных БАВ. Соответственно, для оценки потенциальной эффективности новой формы биологически активных веществ в виде концентратов минорных БАВ, комплексированных с полимерными пищевыми матрицами, 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 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, в составе концентрата с коагулированным белком куриного яйца.
6. Проведение экспериментов (двух) *in vivo* по сравнительной физиолого-биохимической оценке влияния потребления полифенолов, экстрагированных из листьев и ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, на нарушения углеводного и/или липидного обмена у мышей линии C57Bl/6, индуцированные потреблением высокожирового 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 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов, экстрагированных из зерна черного киноа, в составе концентрата с коагулированным белком 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, в составе концентрата с

коагулированным белком 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 [40, 138, 157].

В области клинической нутрициологии обсуждается также проблема использования в качестве фитоадаптогенов, повышающих устойчивость организма человека к неблагоприятным стрессорным воздействиям различного генеза, фитоэкдистероидов - полигидроксилированных стероидов, являющихся структурными аналогами гормонов линьки и метаморфоз членистоногих [47]. Множественность (плейотропность) биологического действия 20-гидроксиэкдизона, как наиболее изученного экдистероида, объясняется его участием в PI3K пути активации серин-треониновой протеинкиназы B (PKB), являющейся ключевой в регуляции клеточной активности [21]. 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 трех новых

пищевых ингредиентов в виде концентратов растительных полифенолов, экстрагированных из листьев или ягод черники, и мажорного фитоэкдистерода 20-гидроксиэкдизона, экстрагированного 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, в том числе антоцианинов) листьев и ягод черники, с полимерной белково-углеводной матрицей (измельченной гречневой мукой). Количественно охарактеризован профиль сорбируемых полифенолов.

Впервые установлено, что потребление в течение 130 суток концентрата полифенолов листьев черники с полимерной белково-углеводной матрицей снижает уровень глюкозы крови, предотвращает развитие толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности, регулирует уровни лептина и грелина в крови молодых половозрелых мышей-самцов линии C57Bl/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 с полимерной белково-углеводной матрицей на уровень инсулина и лептина в крови молодых половозрелых мышей-самцов линии C57Bl/6 с нарушениями углеводного и жирового обмена, индуцированными ВЖВУ рационами.

Впервые установлен анксиолитический эффект потребления в течение 109 суток концентрата полифенолов ягод черники с полимерной белково-углеводной матрицей на молодых половозрелых мышей линии C57Bl/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 данные об адаптогенном действии на молодых крыс-самцов линии Вистар потребления ими концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов из зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца: снижение тревожности в условиях принудительной иммобилизации (в течение 3 часов) и регуляция экскреции катехоламинов с мочой после физической нагрузки.

Разработка, характеристика и физиолого-биохимическая оценка *in vivo* модельного пищевого ингредиента 1 – концентрата полифенолов экстракта листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, выполнена в рамках гранта РФФИ (Проект № 14-36-00041).

Разработка, характеристика и физиолого-биохимическая оценка *in vivo* пищевого ингредиента 2 – концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, выполнена в рамках государственной бюджетной темы (Проект № 0529-2019-0055).

Разработка, характеристика и физиолого-биохимическая оценка *in vivo* пищевого ингредиента 3 – концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, выполнена в рамках гранта РФФИ (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 последующей их сорбцией на пищевых матрицах различной биополимерной природы, с комплексным физико-химическим исследованием *in vitro* и физиолого-биохимическим исследованием тестированием их эффективности *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 киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, позволит получать 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 разработанного специализированного пищевого продукта – «Концентрата киселя с бета-глюканами, полифенолами, витаминами».

Полученные *in vivo* результаты физиолого-биохимического тестирования, подтверждающие антистрессорные свойства концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна 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 работы 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 (Приложения А,Б).

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. Подробное описание методов исследования представлено в разделе «Материалы и методы».

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

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 гипополидемическое 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 гипополидемическое 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 20 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, наукометрической базе данных Russian Science Citation Index (RSCI) и в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад соискателя

Все изложенные в диссертации результаты получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Цель, задачи исследования, дизайны экспериментов *in vivo* разработаны совместно с научным руководителем. Автор обоснованы выбор объектов исследования и методологические подходы к их изучению. Автор самостоятельно получал исследуемые пищевые ингредиенты, осуществлял все манипуляции с животными, проводил пробоподготовку образцов для аналитических исследований, а также выполнял статистическую обработку полученных данных.

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. Список литературы включает 164 источник, из которых 22 отечественных и 142 зарубежных. К диссертации прилагаются 2 приложения.

Благодарность

Автор выражает багодарность 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, проведении и обсуждении результатов экспериментов *in vivo*.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика полифенольных соединений: классификация, структура, биологические свойства

Полифенольные соединения – уникальная группа фитохимических соединений, присутствующих, как в пищевом, так и в лекарственном растительном сырье. Полифенолы относятся к вторичным продуктам метаболизма растений, участвуют во многих ключевых процессах роста и развития, позволяя растениям адаптироваться к меняющейся среде обитания. Полифенолы не синтезируются в клетках животных и человека, и их присутствие в тканях полностью зависит от потребляемых в пищу растительных продуктов. Основными источниками природных полифенолов являются фрукты и овощи, чай, виноград/вино, оливковое масло, кофе, шоколад, арахис.

На текущий момент известно более 8000 полифенольных соединений, они могут быть классифицированы в зависимости от источника, биологической функции, но самой распространенной считается классификация в зависимости от строения углеродного скелета.

Первая группа - фенольные кислоты – являются производными ароматических углеводов, у которых водород замещен на карбоксильные и гидроксильные группы. Условно можно выделить две больших подгруппы этих соединений: бензойные кислоты и коричные кислоты, различающиеся структурой углеродного скелета: C1-C6 для бензойных кислот и C3-C6 для коричных [150]. Эти соединения редко встречаются в свободной форме и в основном конъюгированы с другими полифенолами, углеводами и иными структурными компонентами растений [42].



Рисунок 1 – Структура фенольных кислот

Вторая большая группа полифенолов - стильбены, в структуре которых содержатся два фенольных кольца (С6-С2-С6). Они представлены цис- и транс-изомерами, способными к взаимному переходу. Большую биологическую активность проявляет транс-форма. Основным представителем этой группы является ресвератрол.

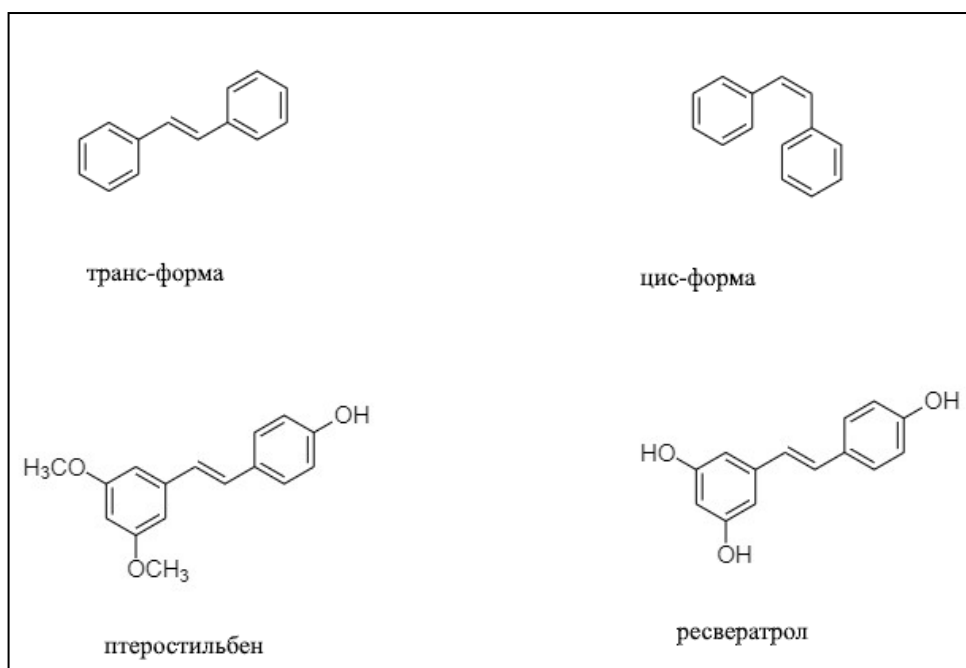


Рисунок 2 – Структура стильбенов

Флавоноиды составляют третью, наиболее многочисленную группу природных полифенольных соединений, в основе которых лежит дифенилпропановый скелет. Структурными элементами этих молекул являются два ароматических кольца А и В, содержащие различное количество фенольных гидроксиллов и других заместителей и соединенные

между собой пропановым (C_3) мостиком, посредством которого в молекулах большинства флавоноидов образуется гетероцикл [9]. На основании различий в структуре трех углеродных атомов, соединяющих фенольные кольца, флавоноиды подразделяются на следующие классы: флаваны, флавоны, флавонолы, флаваноны, изофлавоны, халконы, антоцианины, ауруны, неофлавоноиды.

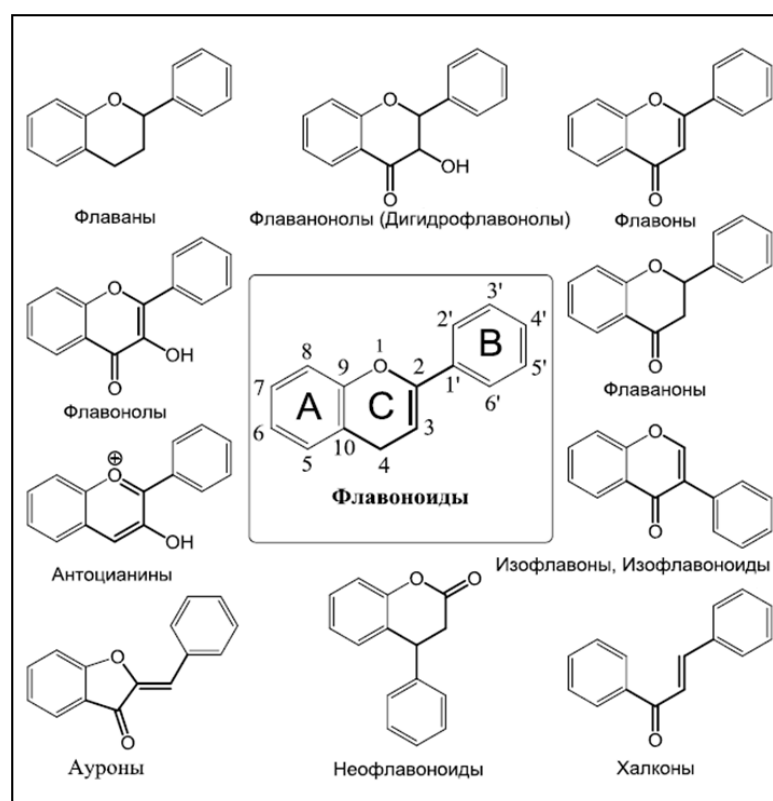


Рисунок 3 – Структура флавоноидов

Еще одна крупная группа полифенольных соединений – танины (дубильные вещества). Несмотря на большое структурное разнообразие олигомерных и полимерных молекул, танины можно разделить на две основные подгруппы: гидролизуемые танины и проантоцианидины, или конденсированные танины, которые устойчивы к гидролитической деградации. Танины содержат ароматические кольца с гидроксильными группами, что обуславливает их высокую химическую активность [145].

1.1.1 Биологические свойства полифенольных соединений

Широкий спектр проявлений биологической активности полифенолов во многом определяется их антиоксидантными свойствами. Наличие сопряженных структур в молекулах полифенолов позволяет им выступать в качестве улавливателей свободных радикалов – гасителей цепных реакций свободнорадикального окисления [51, 53, 94].

В *in vitro* исследовании [37] метанольные и водные экстракты полифенолов из *Retama sphaerocarpa* демонстрировали высокую антиоксидантную активность при тестировании способности нейтрализовать 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH assay), железо-восстанавливающей активности (FRAP assay) и способности поглощения кислородных радикалов (ORAC assay).

В работе [51] флавоноиды, полученные из *Ligaria cuneifolia* проявляли значительную антиоксидантную активность, выступая в качестве доноров атомов водорода в системах *ex vivo*, прерывая и ингибируя процесс перекисного окисления липидов в гомогенатах печени крыс-самок линии Sprague-Dawley, а также предотвращая H₂O₂-индуцированные повреждения ДНК в крови доноров-добровольцев.

В работе [49] исследовали антиоксидантную активность полифенольных соединений в составе этанольного экстракта тростниковой мелассы в исходном виде и сорбированных на смоле. Как для исходного экстракта мелассы, так и для полифенолов мелассы, сорбированных на смоле, установлен высокий уровень способности к поглощению кислородных и гидроксильных радикалов. В эксперименте с использованием линии клеток HepG2 человека было выявлено, что полифенолы, сорбированные на смоле, показывали в 3 раза более высокий уровень антиоксидантной активности по сравнению с исходным экстрактом.

Помимо этого, полифенолы проявляют выраженные противовоспалительные эффекты [107, 159], реализуемые посредством

различных механизмов, в частности, путем ингибирования регуляторных ферментов и транскрипционных факторов, участвующих в контроле активности медиаторов воспалительного процесса [93].

В исследовании *in vitro* [112] введением интерлейкина-1 β у эпителиальных легочных клеток человека линии A549 вызывали воспалительные процессы. Флавоноид фисетин, вводимый в клетки в дозе 30 мкмоль/л, ингибировал экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2), простагландина E2, снижал уровни интерлейкина-8 (IL-8), моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1), фактора некроза опухоли альфа (TNF α).

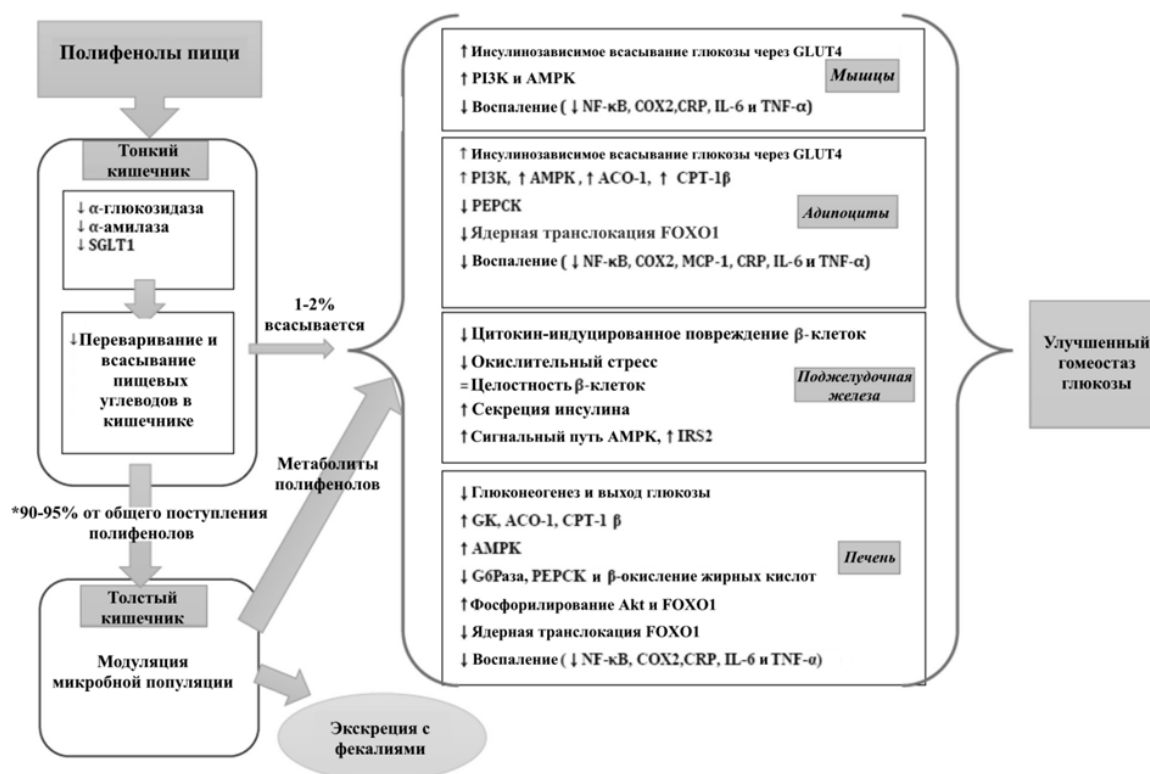
In vivo на модели ожирения показано ингибирующее влияние полифенолов корицы на активность ферментов, участвующих в развитии воспалительных процессов. Крысы линии Вистар в течение 12 недель потребляли высокожировую рацион и ежедневно в течение эксперимента внутрибрюшинно получали экстракт полифенолов корицы в дозе 100 мг/кг массы тела. Потребление экстракта приводило к ингибированию экспрессии белка, связывающего стеролрегулирующие элементы, типа 1c (SREBP-1c), печеночного рецептора X типа α (LXR α), цитратрасщепляющего фермента (ACLY), синтазы жирных кислот (FAS), ядерного фактора κ B типа p65 (NF- κ B p65). При этом имело место увеличение экспрессии рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом α (PPAR α), субстрата рецептора инсулина типа 1 (IRS-1), транскрипционного фактора Nrf2, и гемоксигеназы 1 (HO-1) в печени животных [151].

Важной направленностью метаболического действия полифенолов является также способность участвовать в регуляции обмена глюкозы в организме. В исследовании *in vitro* на ряде клеточных линий фибробластов и адипоцитов было показано регулирующее влияние флавоноидов экстракта *A. cominia* на уровень инсулина, что в свою очередь способствовало увеличению поглощения глюкозы клетками [132]. В клиническом исследовании [101] у пациентов, получавших препарат с полифенольными соединениями бергамота, отмечалось снижение уровня глюкозы натощак,

липопротеинов низкой плотности и триглицеридов в крови наряду с повышением уровня липопротеинов высокой плотности.

Гипогликемические эффекты пищевых полифенольных соединений могут быть связаны с замедлением переваривания углеводов путем ингибирования слюнной и панкреатической α -амилазы и α -глюкозидазы в щеточной кайме тонкой кишки, ингибирования абсорбции глюкозы и стимуляции секреции инсулина и защиты панкреатических β -клеток против глюкотоксичности. Полифенолы могут подавлять высвобождение глюкозы из печени и улучшать захват глюкозы периферическими тканями путем модуляции внутриклеточной передачи сигналов [67]. Поглощение глюкозы в кишечнике регулируется активным транспортом с помощью натрий-зависимого транспортера глюкозы SGLT1 и облегченным натрий-независимым транспортом посредством транспортера глюкозы GLUT2 [81, 103].

Схема на рисунке 4, отражает современные представления о возможных механизмах, посредством которых осуществляется влияние полифенолов на метаболизм глюкозы.



Примечание – ↑ увеличение, ↓ снижение, = поддержание стабильности; * - 90-95% полифенолов попадают в толстый кишечник. SGLT1 – натрий зависимый переносчик глюкозы 1, GLUT4 – переносчик глюкозы 4, PI3K – фосфоинозитид 3-киназа, AMPK – 5' аденозин монофосфат-активируемая протеинкиназа, NF-κB, ядерный фактор каппаB, COX2 – белок циклооксигеназы-2, CRP – С-реактивный белок, IL-6 – интерлейкин 6, TNF-α – фактор некроза опухоли α, FOXO1 – фактор транскрипции FOXO1, MCP-1 - хемоаттрактантный белок моноцитов 1, IRS 2 - субстрат рецептора инсулина 2, GK – глюкокиназа, ACo-1 – ацил CoA оксидаза 1, G6Pаза – глюкоза-6-фосфатаза

Рисунок 4 – Краткое изложение потенциальных механизмов, связывающих метаболиты полифенолов с улучшением гомеостаза глюкозы

Гиполипидемические эффекты полифенолов установлены в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*

В исследовании [127] с использованием линии раковых клеток HeLa показано, что флавоноид эупатилин способен защищать жирные кислоты и холестерин от перекисного окисления, регулировать соотношение фосфолипиды/холестерин в клетках, снижать содержание олеиновой и пальмитиновой кислот с одновременным увеличением уровня стеариновой кислоты, таким образом, ингибируя липогенез в исследуемых клетках.

В работе [48] у крыс линии Sprague-Dawley вызывали дислипидемию подкожной инъекцией глюкокортикоида - натриевого сукцината метилпреднизолона. Три раза в неделю в течение 6 недель животные получали подкожную инъекцию глюкокортикоида, а также перорально кверцетин в дозе 150 мг/кг массы тела. Кверцетин приводил к достоверному снижению уровней холестерина, липопротеинов низкой плотности и триглицеридов в плазме крови животных.

В работе [52] с использованием крыс-самцов линии Sprague-Dawley, получавших в течение 12 недель высокожировую рацион, изучались гиполипидемические эффекты полифенолов в составе уксуса региона Шаньси. В течение 4 последних недель эксперимента животным внутрижелудочно вводили полифенолы уксуса в дозе 16 мг/кг массы тела. Отмечено достоверное снижение уровней общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов низкой плотности, малонового диальдегида, а также увеличение уровней липопротеинов высокой плотности, супероксиддисмутазы и глутатиона.

1.2 Полифенолы листьев и плодов черники

Широкий спектр полифенолов содержится в ягодах и листьях черники традиционно используемых в народной медицине при нарушениях углеводного обмена [46, 98, 104]. Исследования гипогликемического действия экстрактов из листьев черники начались еще в двадцатые годы прошлого века. В частности, в обзорной статье того периода [154] отмечалось, что экстракты из листьев черники снижают уровень сахара в крови при легких формах сахарного диабета у лиц среднего и пожилого возраста. К настоящему времени относительно подробно исследован полифенольный профиль как листьев, так и ягод черники.

Согласно [149] содержание полифенолов в листьях черники *Vaccinium myrtillus* значительно выше, чем в ее плодах. Полифенольные соединения в

составе листьев черники *Vaccinium myrtillus* представлены следующими основными классами: гидроксикоричными кислотами, флавонолами, флаванолами, проантоцианидинами и антоцианинами. Однако качественный и количественный состав полифенольных соединений, определяемый в листьях, может различаться в зависимости от места произрастания растения, сезона сбора сырья и метода экстракции полифенолов из листьев [141, 142].

В обзорной работе [142] приводятся данные о том, что мажорными полифенольными соединениями листьев черники *Vaccinium myrtillus* являются производные хлорогеновой кислоты (7,8 мг/г) и кверцетина (3,4 мг/г), а также обнаруживаются процианидины (0,9 мг/г).

Около 80% от суммарного количества полифенольных соединений в составе экстракта этанольного экстракта листьев черники, произрастающей в Финляндии, составили хлорогеновые кислоты, мажорным соединением среди них является 3-О-кофеилхиновая кислота (12,83 мг/г). Флаван-3-олы представлены одним соединением – эпикатехином (0,43 мг/г). Среди гликозидов флавонолов идентифицированы кверцетин-3-О-глюкуронид (1,04 мг/г) и кемпферол-3-О-глюкуронид (0,42 мг/г) [139].

В исследовании [141] изучали полифенольный состав листьев черники *Vaccinium myrtillus*, произрастающих в трех различных регионах Румынии (собраны в осенний сезон). Экстракцию полифенольных соединений проводили путем выдерживания смеси измельченных листьев с 40% этанолом в ультразвуковой ванне, с последующим центрифугированием. В этанольно-водных экстрактах было идентифицировано 21 фенольное соединение четырех основных классов: гидроксикоричные кислоты, флавонолы, флаванолы и антоцианины. Согласно данным, представленным в этой работе, больше всего в листьях содержится флавонолов, а именно производных кверцетина (до 68 мг/г). Мажорными соединением среди них являются рутин (до 49 мг/г) и флаванолы (до 60 мг/г).

В работе [38] было проведено сравнительное исследование влияния различных методов экстракции (мацерации, кипячения, непрерывной

циклической экстракции) на полифенольный состав экстрактов из листьев черники, произрастающей в горных регионах Черногории. Идентифицированы следующие мажорные соединения: хлорогеновая кислота (при экстракции кипячением: 59,7 мг/г), изокверцетин (при экстракции кипячением: 16,2 мг/г), ресвератрол (5,2 мг/г при непрерывной циклической экстракции), рутин (4,9 мг/г при непрерывной циклической экстракции), кверцетин (самое высокое содержание отмечено при непрерывной циклической экстракции: 7,27 мг/г).

Основными полифенольными соединениями, идентифицированными в ягодах черники, являются флавоноиды, в частности антоцианины (134,0 мг/кг), флавонолы (38,7 мг/кг) и флаванолы (1,1 мг/кг), а также фенольные кислоты, а именно гидроксикоричные кислоты (135,0 мг/кг) и гидроксibenзойные кислоты (1,5 мг/кг) [98, 158]. Согласно данным работы [149] мажорными компонентами ягод черники являются гликозиды дельфинидина (57,6% от суммарного содержания антоцианинов), цианидина (23,7%), мальвидина (14,1%), петунидина (3,3%) и пеонидина (1,3%). Гликозиды флавонолов представлены мирицетин-3-О-глюкуронидом, кверцетин-3-О-глюкозидом, мирицетин-3-О-галактозидом и мирицетин-3-О-глюкозидом.

Антиоксидантные, гипогликемические и гиполипидемические свойства экстрактов из листьев и плодов черники широко исследованы в экспериментах *in vitro*, *in vivo* и в клинических условиях. [4, 8, 11].

В опытах *in vitro* с использованием культуры липосом экстракты ягод черники, содержащие в своем составе до 25% антоцианов, проявляли высокую антиоксидантную активность, оцениваемую по способности поглощать радикалы 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила, а также ингибировали процессы перекисного окисления липидов [152]. В исследовании [72] охарактеризовано влияние метанольного экстракта антоцианинов ягод черники на модели эпителиальных клеток пупочной вены человека (ЭКПВЧ), подверженных окислительному стрессу. Введение экстракта увеличивало в

клетках уровни экспрессии ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и гемоксиназы-1 (ГО-1), проявляя, таким образом, антиоксидантную активность и снижая экспрессию НАДФН-оксидазы 4, (повышая тем самым функцию эндотелия за счет снижения активности НАДФН-оксидаз как ферментов, участвующих в образовании супероксидов).

В исследовании *in vitro* [68] в гепатоциты линии HepG2 вводили глюкозу в высокой дозе (30 ммоль/л). При введении экстракта ягод черники в клетки повышалась экспрессия АМФ-зависимой протеинкиназы, путем снижения количества активных форм кислорода, что, в свою очередь, приводило к торможению развития гипергликемии и гиперлипидемии. АМФ-зависимая протеинкиназа ингибирует множество факторов, вовлеченных в синтез глюкозы, включая коактиватор-1 α рецептора γ , активируемого пероксисомными пролифераторами, транскрипционный фактор семейства forkhead box класса O1, фосфоенолпируваткарбокскиназу, глюкозо-6-фосфатазу и гликогенсинтазу. Также АМФ-зависимая протеинкиназа ингибирует активность GLUT-2, что замедляет транспорт глюкозы, и стимулирует активность киназы гликогенсинтазы 3 β , которая участвует в гликогенолизе. Все эти процессы в совокупности приводят к снижению концентрации глюкозы в крови. Также введение экстракта ягод черники в клетки способствовало снижению активности ацетил-коэнзим А карбоксилазы (фермента, участвующего в липогенезе) путем увеличения темпов ее фосфорилирования, а также снижению синтеза холестерина, посредством снижения уровней экспрессии 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазы и гормончувствительной липазы.

В работе [73] антоцианины ягод черники оказывали противовоспалительное и антиоксидантное действие на клетки сетчатки человека, подверженные окислительному стрессу. Окислительный стресс моделировали путем введения в клетки глюкозы в большой концентрации (30 ммоль/л). Показано, что введение экстракта ягод в клетки повышало их

выживаемость до 79%, что достоверно превышало контрольное значение (64%).

И в опыте *in vivo* выявлено снижение окислительного стресса и воспаления в сетчатке глаз крыс-самцов линии Sprague-Dawley со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, получавших в течение 12 недель антоцианины черники в дозе 80 мг/кг массы тела [139].

Согласно данным работы [133] антоцианы ягод черники также способны замедлять накопление в сыворотке крови церамидов, диглицеридов, триглицеридов и холестерина, предотвращая таким образом, нарушение липидного обмена. Это было показано в эксперименте *in vivo* на мышцах самцах линии C57Bl/6, которые в течение 8 недель получали высокожировой рацион. В сыворотке крови животных получавших в течение эксперимента внутрижелудочно экстракт ягод черники в дозе 200 мг/кг отмечено достоверное снижение уровней триглицеридов, холестерина с одновременным повышением уровня ЛПВП. Также у животных, получавших экстракт ягод черники, отмечено снижение экспрессии генов, участвующих в синтезе церамидов - SGMS1 и SGMS2.

Пероральное введение настоя из измельченных побегов черники пазушной белым крысам-самцам (250-300 г) натошак за 40 минут до введения глюкозы (2 г/кг массы тела) оказывало выраженное гипогликемическое и глюкозурическое действие, снижая к 60-120 минутам опыта уровень глюкозы в крови относительно исходных значений более чем на 20% и повышая утилизацию глюкозы с мочой [11].

В исследовании, представленном в работе [68], у мышей-самцов линии C57Bl/6J нарушения углеводного и липидного обмена индуцировали потреблением в течение 5 недель высокожирового высокоуглеводного рациона с инъекцией стрептозотоцина. По истечению 5 недель животных переводили на стандартный рацион и в течение 6 последующих дней внутрижелудочно вводили экстракт ягод черники в дозе 400 мг/кг массы

тела. Согласно результатам исследования экстракт ягод черники эффективно снижал уровни холестерина и триглицеридов в крови животных.

Потребление полифенольных соединений предотвращало развитие гиперлипидемии и ожирения у мышей линии C57Bl/6, получавших высокожировую рацион и ферментированный черничный сок в качестве питья в течение 17 недель. Полифенольные соединения в составе сока предотвращали накопление жира, рост адипоцитов, снижали уровень общего холестерина и ЛПНП в крови животных [164].

В исследовании [78] ежедневное потребление этанольного экстракта полифенолов черники мышами-самцами линии C57Bl/6J, получавшими в течение 12 недель высокожировую рацион, в дозе 200 мг/кг массы тела приводило к снижению уровней холестерина, триглицеридов и ЛПНП в крови животных, а также снижению экспрессии рецептора γ , активируемого пероксисомными пролифераторами, синтаз жирных кислот и белка, связывающего стеролрегулирующие элементы, типа 1.

1.3 Метаболизм полифенолов в желудочно-кишечном тракте

Первым этапом в сложном процессе ассимиляции полифенолов в составе потребляемой пищи, является их высвобождение из пищевого матрикса. Пережевывание в ротовой полости инициирует этот процесс, и дальнейшее разрушение пищевой матрицы осуществляется под действием пищеварительных ферментов в желудке, тонкой и толстой кишке [36, 62, 85, 86]. На этот процесс влияет состояние различных отделов пищеварительной системы (рН среды, функционирование различных клеточных транспортеров, взаимодействие с микрофлорой кишечника). В энтероцитах протекают процессы метаболизма и реконъюгации полифенольных соединений, которые затем поступают в кровоток и транспортируются в печень в свободном виде, в комплексах с белками или в составе комплексов с липопротеинами. При дальнейшем поступлении в гепатоциты полифенолы

1.4 Технологические подходы к повышению эффективности полифенольных соединений

Современные подходы к способам повышения биодоступности и всасывания полифенолов пищи, включают широкий спектр технологических решений, направленных на формирование заданного состава и физико-химических свойств пищевой матрицы, которая, являясь средством доставки полифенольных соединений, одновременно может повышать их устойчивость к ферментативному расщеплению в ЖКТ, возможность всасывания в биологически активной форме, биодоступность и, в конечном итоге, эффективность [36, 85, 148].

В обзорных работах [85, 148] на основании научных публикаций экспериментальных и клинических исследований и патентной литературы выделяют такие технологии повышения биодоступности полифенольных соединений при пероральном приеме, как формирование комплексов фосфолипиды-полифенолы; комплексов включения с циклодекстринами и дендримерами (молекулами, имеющими симметричную древообразную структуру); использование адьювантов в качестве средств, повышающих всасывание; использование микросфер, микрокапсул или нанокапсул в качестве транспортных систем с контролируемым высвобождением для пероральной доставки полифенолов; использование полифенолов в составе твердых дисперсий – многофазных смесей с доминирующим полимерным компонентом; совместное введение полифенолов с другими биологически-активными соединениями, усиливающими их всасывание, в том числе введение так называемых сокристаллов; применение различных эмульгирующих систем.

Как отмечается в работах [50, 155, 157], полученные посредством вышеуказанных технологических подходов комплексы полифенолов с носителями или транспортными системами, характеризуются, среди прочего, более высокой растворимостью и стабильностью, более устойчивым поступлением, усиленной фармакологической активностью и большей

безопасностью по сравнению с традиционными композициями; они также лучше защищены от деградации.

В работе [157] методом кристаллизации с использованием противорастворителя получали нанокристаллы ресвератрола размером $222,54 \pm 1,66$ нм. В исследовании на клеточной линии MDCK показано увеличение всасываемости ресвератрола в виде нанокристаллов, по сравнению со свободным ресвератролом.

В исследовании [89] отмечено увеличение растворимости силибинина, инкапсулированного в наносферы. В эксперименте *in vivo* в крови крыс-самцов линии Sprague-Dawley был отмечен более высокий уровень инкапсулированного силибинина, по сравнению со свободным соединением, через 2 часа после перорального введения.

В работе [134] технологией эмульсификации под высоким давлением были получены наноэмульсии кверцетина и галловой кислоты, обладающие большей растворимостью и устойчивостью к деградации по сравнению со свободными соединениями.

Авторы работы [128] исследовали антиоксидантную активность полифенолов эпикатехин галлата и эпигаллокатехин галлата инкапсулированных в β -циклодекстрин. Согласно полученным результатам, инкапсулированные полифенолы характеризовались большей растворимостью и большей антиоксидантной активностью по сравнению со свободными соединениями.

В работе [87] птеростильбен в комплексе с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином проявлял более выраженные антимикробные эффекты, приводя к истончению клеточных стенок и снижению общей выживаемости бактерий *Fusobacterium nucleatum*, по сравнению со свободным соединением. В экспериментах с использованием макрофагов RAW 264.7 показано иммуномодулирующее действие птеростильбена в комплексе с циклодекстрином, выражающееся в стимуляции антиоксидантных

сигнальных путей, а также в предотвращении активации ядерного фактора κB (NF-κB).

В исследовании [140] получали твердую дисперсию ресвератрола с дигидроксидом магния. В *in vivo* эксперименте с использованием кроликов линии New Zealand White hybrid показано увеличение всасываемости ресвератрола в составе твердой дисперсии по сравнению со свободным ресвератролом. Уровень ресвератрола в крови животных спустя 90 мин после введения твердой дисперсии был достоверно выше по сравнению с введением свободного ресвератрола, при этом к 180 минуте ресвератрол, вводимый как в свободном виде, так и в составе твердой дисперсии, в крови не детектировался.

Аналогичный результат получен в работе [110] с использованием твердой дисперсии полифенола даидзеина с поливинилпирролидоном и додецилсульфатом натрия. В эксперименте с крысами-самцами линии Вистар показан более высокий уровень даидзеина в составе твердой дисперсии в плазме крови животных уже через 15 мин после перорального введения по сравнению со свободным даидзеином.

Набирает популярность технология получения фитосом, основанная на взаимодействии полифенолов с фосфолипидами и позволяющая повышать стабильность и всасывание полифенолов в ЖКТ [1]. Технология получения фитосом предполагает включение фосфолипидов (таких как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин) в стандартизованные полифенольные растительные экстракты с использованием апротонных растворителей (диоксана, этилацетата, ацетона) в соотношении 1:1 или 2:1. В качестве компонентов липидной фазы обычно используют фосфолипиды сои, главным образом, фосфатидилхолин. Фосфатидилхолин растворяется как в водной, так и в липидной среде и хорошо всасывается в ЖКТ. В структуре молекулы фосфатидилхолина выделяются две части: гидрофильная часть – холин, которая взаимодействует с полифенолом, и липофильная часть – остатки жирных кислот, которые

образуют вокруг молекулы полифенола сферическую «мембрану», защищающую его от деградации в ЖКТ.

Инкапсуляция слаборастворимых полифенольных соединений в фитосомы значительно улучшает всасываемость соединений, что приводит к повышению проницаемости полифенолов сквозь клеточную мембрану и, соответственно, увеличению их биодоступности [28]. Фитосомы обладают увеличенной способностью преодоления липидного слоя клеточных мембран и растворения в желудочных жидкостях [1].

В исследовании [100] 80 пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени ежедневно в течение 2-х месяцев получали 250 мг куркумина, инкапсулированного в фитосомы. Потребление такой формы куркумина привело к достоверному снижению уровня АСТ в сыворотке крови пациентов. В работе [123] с привлечением 12 добровольцев оценивали изменения биодоступности кверцетина в составе фитосомы на основе лецитина. Уровень кверцетина в плазме крови после потребления фитосом был в 20 раз выше, чем при потреблении свободного кверцетина, при отсутствии каких-либо побочных эффектов. В клиническом исследовании [101] с привлечением 60 пациентов с диабетом и гиперлипидемией проведена сравнительная оценка влияния полифенольного экстракта бергамота в некомплексированном виде и в составе фитосом. Как исходный экстракт, так и полифенолы бергамота в составе фитосом способствовали достоверному снижению уровней глюкозы, ЛПНП и триглицеридов в крови при одновременном росте уровня ЛПВП, при этом, при потреблении фитосом отмечено в 2,5 раза более высокое содержание полифенолов в крови по сравнению с исходным экстрактом.

Особый интерес представляет изучение взаимодействия полифенолов с другими нутриентами (как в составе пищевой матрицы, так и вне её) [31, 36, 62, 97]. Образование комплексов полифенолов с белками существенным образом влияет на пути их метаболизма и соответственно модифицирует их биологическое действие.

Взаимодействие полифенолов с белками зависит как от структуры полифенола, так и структуры белка, а также рН раствора, ионной силы, температуры, соотношения полифенол/белок [7, 43, 153]. При связывании имеют место гидрофобные взаимодействия ароматических групп аминокислотных остатков белка и полифенолов и/или гидроксильных групп полифенолов с белковой цепью [33, 40, 80, 146]. Такое связывание может явиться причиной изменения пространственной структуры белка и оказывать влияние на активность обоих компонентов.

С технологической точки зрения в плане повышения эффективности использования полифенолов в составе специализированной пищевой продукции (диетических профилактических и диетических лечебных продуктов) особый интерес представляют исследования сорбционной способности различных видов муки и изолятов белков по отношению к полифенолам в составе соков и растительных экстрактов [124, 125, 126].

Так в работе [124] исследовали сорбционную способность обезжиренной соевой муки, цельной пшеничной муки, муки коричневого риса и кукурузной муки. В качестве источника полифенолов использовали коммерческий концентрат черничного сока. Муку добавляли к 50 мл сока черники в концентрации 5г/л и перемешивали в течение 5 мин. Далее раствор центрифугировали, отделяли супернатант от осадка. В исходном соке черники и в супернатантах рН-дифференциальным методом определяли содержание антоцианинов, по разнице определяли количество антоцианинов, сорбированных на муке. Согласно результатам исследования, наибольшей сорбционной способностью обладает обезжиренная соевая мука (содержание антоцианинов $4,2 \pm 0,1$ мг/г). За ней следуют пшеничная ($3,0 \pm 0,2$ мг/г), рисовая ($2,7 \pm 0,1$ мг/г) и кукурузная ($1,8 \pm 0,2$ мг/г). При этом авторы работы отмечают, что отсутствует зависимость между количеством сорбированных антоцианинов и содержанием белка в муке и предполагают, что в процессе сорбции также участвуют углеводы в составе муки. Отмечено повышение

стабильности полифенольных соединений при хранении – содержание полифенолов в комплексе оставалось постоянным в течение 20 недель.

В исследовании [63] было показано, что сорбция полифенолов сока клюквы на обезжиренной соевой муке или изоляте соевого белка увеличивает стабильность полифенолов при хранении при повышенных (37°C в течение 15 недель) и высоких (80°C в течение 90 мин) температурах. Сенсорный анализ показал, что вкусовые характеристики комплекса полифенолов сока клюквы с изолятом соевого белка значительно отличались от исходного изолята: опрашиваемые дегустаторы отмечали близость вкуса комплекса к некоторым кондитерским изделиям.

Предложенный авторами этих работ относительно простой технологический подход концентрирования растительных полифенолов позволяет получать пищевые ингредиенты высокой биологической и пищевой ценности, характеризующиеся низким содержанием легкоусвояемых простых углеводов и жиров. Сорбция полифенолов на белковом матриксе существенно повышала также их устойчивость к деградации при высоких температурах и низких значениях pH.

В *in vitro* исследовании [121] на модели желудочно-кишечного тракта человека ТИМ-1 (включающей желудок, двенадцатиперстную кишку, тощую кишку и подвздошную кишку) было показано увеличение всасываемости антоцианинов сока черники, сорбированных на обезжиренной соевой муке, по сравнению с черничным соком. Концентрация антоцианинов в кишечном эффлюксе для комплекса сока с мукой была в 2,8 раза выше по сравнению с исходным соком.

В работе [122] получали комплекс полифенольного экстракта тархуна (*Artemisia dracunculus L.*) с изолятом соевого белка. На модели желудочно-кишечного тракта ТИМ-1 (компьютеризированной системе, моделирующей условия переваривания в желудке и верхних отделах тонкого кишечника) показано, что основной полифенол экстракта тархуна – халкон 2',4'-дигидрокси-4-метоксидигидрохалкон (ДМХ-2) сохранял стабильность в

составе комплекса с изолятом соевого белка. Концентрация ДМХ-2 в эффлюксе для комплекса составляла 80% от начальной концентрации по сравнению с исходным экстрактом, в эффлюксе которого сохранилось только 45% ДМХ-2.

В рамках того же исследования проведена *in vivo* оценка гипогликемической активности комплекса полифенолов экстракта тархуна с изолятом соевого белка. Мышам-самцам линии C57Bl/6 однократно перорально вводили экстракт тархуна и комплекс экстракта тархуна с изолятом соевого белка в дозе 500 мг/кг массы тела, а также метформин в качестве позитивного контроля. Спустя 6 часов после введения, уровень глюкозы у животных, получавших экстракт и комплекс, достоверно не отличался. Однако авторы отмечают, что в случае экстракта мыши получали 600 мкг ДМХ-2 на кг массы тела, а в случае комплекса – 40 мкг/кг массы тела. Это позволило сделать вывод, что сорбция экстракта тархуна на белковой матрице увеличивает эффективность входящих в состав экстракта полифенольных соединений.

В работе [126] в эксперименте *in vivo* оценивали гипогликемические эффекты комплекса полифенолов сока черники, сорбированных на обезжиренной соевой муке. Эксперимент проводили с использованием мышей самцов линии C57Bl/6. Нарушения углеводного и липидного обмена у животных индуцировали высокожировым рационом (37% жира). В течение 13 недель мыши получали комплекс сока черники с соевой мукой в количестве 40% от рациона. Согласно результатам исследования, прирост массы мышей получавших с рационом комплекс был достоверно ниже на 6%, по сравнению с мышами группы сравнения. У этих животных также отмечено достоверное снижение уровня глюкозы натощак, толерантности к глюкозе, а также уровня холестерина в крови.

В исследовании [125] авторы проводили оценку гипогликемических свойств комплекса полифенолов концентрата сока винограда, сорбированных на обезжиренной соевой муке. Показано, что однократное пероральное

введение комплекса в дозе 300 мг/кг массы тела мышам-самцам линии C57Bl/6J, в течение 12 недель получавшим высокожировую рацион (60% жира по калорийности), приводило к достоверному снижению уровня глюкозы крови животных по сравнению с животными контрольных групп.

1.5 Биологически активные вещества зерна черного киноа

Киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.) принадлежит к подсемейству Маревые (*Chenopodiaceae*) семейства Амарантовые (*Amaranthaceae*). В пищу употребляют листья и зерно киноа. Зерно киноа содержит углеводы (77,6%), белок (12,9%), с высоким содержанием лизина и метионина, жир (6,5%), богато клетчаткой, минеральными веществами (3,0%), а содержание калия, кальция, магния, фосфора и железа намного выше, чем у традиционных злаков [56, 69]. В последние годы киноа привлекает к себе внимание благодаря своим исключительным питательным качествам и эффектам на организм.

Зерно киноа является одним из богатых источников полифенольных соединений. Авторы работы [90] исследовали полифенольный состав черного, белого, красного и желтого киноа. С использованием метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией было идентифицировано более 90 соединений полифенольной природы, включая флавоноиды, флавонолы, антоцианины, дигидрофлавоны, дигидрофлавонолы, изофлавоны, флавонолы и халконы. Согласно данным работы [29] основными полифенольными соединениями зерна киноа являются ванильная, феруловая кислоты, эпикатехин, кверцетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-глюкозид, кемпферол-3-О-глюкозид, кемпферол-3-О-рутинозид, даидзеин и генистеин. В исследовании [96] методом ВЭЖХ были идентифицированы следующие мажорные полифенольные соединения: галловая кислота, протокатеховая кислота, катехин, 4-гидроксibenзойная кислота, ванильная кислота, t-феруловая кислота, рутин, о-кумаровая кислота, 3,4-

диметоксикоричная кислота. В составе зерна полифенольные соединения находятся как в свободной, так и в связанной форме [88].

Большое разнообразие содержащихся в составе зерна киноа полифенольных соединений обуславливает широкий спектр проявляемых им биологических активностей (эффектов).

В работе [108] отмечаются антиоксидантные эффекты зерна киноа. В эксперименте *in vitro* показана высокая способность к ингибированию 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида. Аналогичные результаты показаны в исследовании [23], в котором в тестах на железо-восстанавливающую активность и способность к ингибированию 2,2-дифенил-1-пикрилгидразида установлена высокая антиоксидантная активность зерна киноа, подвергнутого гамма-излучению. В исследовании [66] проводили сравнительную оценку антиоксидантной активности метанольных экстрактов зерна белого, черного и красного киноа. Согласно результатам тестов на железо-восстанавливающую активность (FRAP assay) и способность поглощения кислородных радикалов (ORAC assay) наиболее высокими показателями антиоксидантной активности обладали экстракты из зерна красного киноа, затем черного киноа, наименьшей активностью обладали экстракты из зерна белого киноа. Также отмечено, что исследуемые экстракты обладали ингибирующей активностью по отношению к α -глюкозидазе. Аналогичный результат получен в работе [44], где также показана способность водно-спиртового экстракта зерна киноа ингибировать активность α -глюкозидазы, а также ацетилхолинэстеразы, фермента, катализирующего гидролиз ацетилхолина.

В *in vivo* исследовании [137] потребление в течение 12 недель мышами-самцами линии SD зерна киноа в количестве, эквивалентном потреблению 100 г киноа человеком, на фоне высокожирового рациона, предотвращало накопление триглицеридов и холестерина в печени животных, способствовало увеличению активности супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы и снижению уровней малонового диальдегида.

В исследовании [113] оценивали антимикробную и противогрибковую активность спиртовых экстрактов зерна киноа. Авторами выявлена высокая ингибирующая активность зерна киноа по отношению к бактерии *Bacillus cereus* и грибку *Aspergillus ochraceus*.

Отмечаются противовоспалительные эффекты киноа [147]. В работе [106] показано, что потребление в течение 8 недель рациона с включением зерен красного киноа мышами-самцами db/db приводило к снижению, хотя недостоверному, уровня интерлейкина-6 – одного из основных маркеров воспалительных процессов. Снижение повышенного уровня воспалительных цитокинов у мышей линии C57BL/6J, потреблявших в течение трех недель высокожировой рацион с включением экстракта киноа (0,3% от рациона, 6 мг/кг массы тела/сутки), до уровней соответствующих низкожировому рациону было продемонстрировано в работе [58]. Этот эффект может быть связан с уменьшением массы жировой ткани при потреблении экстракта киноа и соответственно меньшей способностью высвобождать адипокины.

Включение киноа в рацион крыс-самцов линии Вистар в качестве основного источника белка способствовало достоверному снижению уровня холестерина и липопротеинов высокой плотности в крови животных всего за 15 суток кормления [115].

В клиническом исследовании [24] с участием 29 пациентов с метаболическим синдромом было показано, что потребление киноа способствовало достоверному снижению значений индекса массы тела и содержания гликированного гемоглобина в крови.

Помимо полифенольных соединений, в составе зерна киноа также присутствуют фитоэкдистероиды, среди которых основным является 20-гидроксиэкдизон [64]. В растениях фитоэкдистероиды выполняют защитную функцию против членистоногих-фитофагов. У млекопитающих фитоэкдистероиды проявляют широкий спектр биологических эффектов, основным из которых считается адаптогенный. В работе [59] внутрижелудочное введение мышам-самцам линии C57Bl/6J метанольного

экстракта корней *Pfaffia glomerata*, обогащенного 20-гидроксиэкдизоном, в дозе 30 мг/кг массы тела предотвращало развитие стресса у мышей, подверженных 12-часовой изоляции (животные содержались в индивидуальных клетках при отсутствии воды, пищи и визуального контакта с другими животными). В аналогичном исследовании [32] внутрижелудочное введение половозрелым беспородным крысам-самцам экдистерона в дозе 5 мг/кг в течение 10 дней перед истощающим иммобилизационным стрессом препятствовало нарушению процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях печени этих животных. В исследовании [61] введение крысам-самцам линии Вистар с болезнью Альцгеймера, индуцированной введением бета-амилоидов, фитоэкдистероида экдистерона в дозе 10 мг/кг массы тела/сутки способствовало улучшению памяти и пространственной обучаемости этих животных по сравнению с животными, не получавшими экдистерон, как было показано в тестах водный лабиринт Морриса и условный рефлекс пассивного избегания.

В клиническом исследовании [74] изучали влияние фитоэкдистероида экдистерона на физическую работоспособность молодых мужчин. В исследовании принимало участие 46 добровольцев, которые получали пищевую добавку, обогащенную экдистероном (100 мг экдистерона в одной порции). На протяжении 10 недель эксперимента испытуемые выполняли упражнения со штангой. Физическую выносливость и работоспособность оценивали с помощью набора базовых прыжковых и силовых упражнений. Согласно результатам исследования, испытуемые, получавшие экдистерон, увеличили свой максимум подъема веса вплоть до 10 кг, в отличие от групп сравнения.

Особый интерес представляют практически не изученные вопросы возможного синергизма в проявлении широкого спектра фармакологических эффектов, определяемых сочетанием фитоэкдистероидов и полифенольных соединений, входящих в состав зерна киноа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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 $95,5 \pm 1,1$ мг-экв. галловой к-ты/1г экстракта.

Ягоды черники (ООО «Мир заморозки», Россия) были предварительно высушены на лиофильной сушке ЛС-500 (ООО «ПРОИНТЕХ», Россия). Ягоды сушили целиком, не подвергая дополнительному измельчению. Влажность свежих ягод составила $81 \pm 0,8\%$.

Опытный образец гречневой муки был получен измельчением промышленной партии пищевой 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%. Гранулометрические характеристики определяли методом электронно-сканирующей микроскопии.

Зерно черного киноа (Nat-Food, Россия) предварительно размалывали на ножевой мельнице GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия) при 8000 об/мин в течение 3 мин и просеивали через сито с диаметром пор 0,35 мм.

Коагулированный белок куриного яйца получали отделением от желтка куриного яйца, перемешиванием жидкой белковой массы, подкислением лимонной кислотой с добавлением хлористого натрия (0,13 и 0,8% соответственно), выдерживанием при температуре 25°C в течение 15 мин и последующей тепловой обработкой смеси при 60-70°C в течение 1-3 мин до достижения структуры зернёного творога при постоянном перемешивании. После отделения жидкой фазы полученный коагулят охлаждали, лиофильно высушивали и измельчали до порошкообразного

состояния [15]. Рекомендуемый срок хранения коагулированного белка с момента получения – 15 суток при температуре 0-4°C.

2.2 Аналитические методы исследования

2.2.1 Гранулометрическая характеристика опытного образца гречневой муки¹

Гранулометрические параметры опытных образцов муки определяли методом электронно-сканирующей микроскопии [118]. Образцы наносили тонким слоем на предметный столик с двусторонним токопроводящим скотчем с последующим ионно-плазменным напылением золота для повышения контрастности изображения. Микрофотографии были получены на сканирующем электронном микроскопе AIS 1800C (Seron Technologies Inc) в режиме вторичных электронов в высоком вакууме. С использованием полученных фотографий рассчитывали критерии размера и формы частиц: эквивалентный радиус (характеризует средний размер частиц неправильной формы) и эллиптичность (характеризует степень отклонения формы частицы от сферической), согласно формулам

Эквивалентный радиус:

$$r_{eq} = \frac{(l+b)}{2} \quad (1)$$

Эллиптичность:

$$k_э = \frac{l}{b} \quad (2)$$

где, l – длина частицы, b – ширина частицы

2.2.2 Определение содержания общих полифенолов

Содержание общих полифенолов в анализируемых образцах определяли спектрофотометрически по методу Фолина-Чокальтеу [10].

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

Полифенольные соединения окисляются реактивом Фолина-Чокальтеу, состоящим из смеси фосфорно-вольфрамовой ($H_3PW_{12}O_{40}$) и фосфорно-молибденовой кислот ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Определение проводили следующим образом. К 1 мл образца добавляли 5 мл раствора Фолина-Чокальтеу, смесь инкубировали в течение 5 минут. После этого добавляли 4 мл 7,5% раствора карбоната натрия и инкубировали в темноте в течение 1 часа. Оптическую плотность растворов измеряли при длине волны 765 нм с использованием спектрофотометра SpectroQuest 2800 (UNICO, США). В растворах определяли концентрацию общих полифенолов, выраженную в мг-экв. галловой кислоты, используя калибровочную кривую, полученную с использованием стандарта галловой кислоты (97,5%, Sigma, США).

2.2.3 Определение суммарного содержания флавоноидов²

Суммарное содержание флавоноидов определяли методом ВЭЖХ (хроматограф Ultimate 3000 (Dionex, США) с диодно-матричным спектрофотометрическим детектором и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором TSQEndura (ThermoFisherScientific, США)) на колонке PhenomenexLunaC18 150*4.6 мм, 5 мкм [12] Пробоподготовку образцов проводили следующим образом. 0,5 образца помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 40 мл 60% водного метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее образец доводили до метки 60% водным метанолом и перемешивали. Аликвоту образца 1,5 мл центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин. Надосадочную жидкость (супернатант) переносили в вialу вместимостью 0,5 мл и помещали в автосемплер.

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

2.2.4 Определение профиля флавоноидов²

Исследование проводили с помощью жидкостного хроматографа Ultimate 3000 (Dionex, США), оснащенного дегазатором, трехканальным насосом, термостатом колонок, термостатируемым автосамплером, диодно-матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД) и тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектором (МС) “TSQ Endura” (Thermo Scientific, США) [3]. В работе были использованы коммерчески доступные стандартные образцы: рутин ($\geq 94\%$, *Sigma-Aldrich*, США), гиперозид ($\geq 95\%$, *HWI ANALYTIK GMBH*, Германия), изокверцитрин ($\geq 94\%$, *HWI ANALYTIK GMBH*, Германия), авикулярин (*ChromaDex*, США), кемпферол-3-глюкозид ($\geq 95\%$, *PhytoLab*, Германия), мирицетин (appr. 85%, *Sigma-Aldrich*, США), кверцетин ($\geq 98\%$, *Sigma-Aldrich*, США), кемпферол ($\geq 99\%$, *Extrasynthese*, Франция), витексин ($\geq 96\%$, *Fluka*), изовитексин ($\geq 99\%$, *Extrasynthese*), лютеолин-7-глюкозид ($\geq 98\%$, *Extrasynthese*), мирицетин (appr. 85%, *Sigma*), кверцетин ($\geq 98\%$, *Sigma*), кемпферол ($\geq 99\%$, *Extrasynthese*), изорамнетин ($\geq 99\%$, *Fluka*), лютеолин ($\geq 99\%$, *Extrasynthese*), апигенин ($\geq 95\%$, *Sigma*). При проведении исследований были использованы следующие растворители и реактивы: вода сверхчистая (*MilliQ® Advantage A10, Merck*, США), ацетонитрил UPLC/HPLC grade производства *AppliChem PanReac* (Дармштадт, Германия), метанол UPLC/HPLC grade производства *J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Пало Альто, США)*, муравьиная кислота 98-100% (*Sigma-Aldrich*, США). Пробоподготовку образцов проводили следующим образом. 0,5 образца помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 40 мл 60% водного метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее образец доводили до метки 60% водным метанолом и перемешивали. Аликвоту образца 1,5 мл центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин. Надосадочную жидкость (супернатант) переносили в виалу вместимостью 0,5 мл и помещали в автосемплер. Условия ВЭЖХ: в качестве

неподвижной фазы использовали колонку Phenomenex Luna C18(2) ID 5 μm 4.6 \times 250 мм; в качестве подвижной фазы А – 0.1% водный раствор муравьиной кислоты, подвижной фазы В – 0.1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. *Условия MS*: ионизация прогреваемым электроспреем (HESI) в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов HESI-MS⁺/ HESI-MS⁻ в диапазоне m/z 100–1000 Да; рабочие параметры источника ионизации: напряжение на капилляре 3500 В, поток газа-осушителя (азот) 10,5 л/мин, поток вспомогательного газа 12,1 л/мин, поток продувочного газа 1,36 л/мин, температура трубки переноса ионов 325 °С, температура испарителя 350 °С. Обработка данных проводилась при помощи программы Thermo Xcalibur 4.2.47 Qual browser.

2.2.5 Определение суммарного содержания антоцианинов²

Суммарное содержание антоцианинов в пересчете на цианидин-3-глюкозид определяли методом рН-дифференциальной спектрофотометрии с помощью спектрофотометра Shimadzu “UV-1800” (Shimadzu Corporation, Япония) с диапазоном длин волн 190-1100 нм [10]. Точную навеску (250-1000 мг) сухих образцов переносили в мерную колбу на 50 мл, добавляли 40 мл воды, экстрагировали на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 15 мин. Аликвоту 10 мл центрифугировали при 15000 об/мин в течение 10 мин и анализировали. Массовую концентрацию суммы антоцианинов в образцах определяли на основе изменения поглощения света с длиной волны 510 нм при изменении кислотности растворов от 1 до 4,5 рН.

2.2.6 Определение профиля индивидуальных антоцианинов²

Профиль индивидуальных антоцианинов количественно оценивали согласно ГОСТ 32709-2014 [1] методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), оснащенном дегазатором, бинарным насосом, термостатом колонок, автосамплером, диодно-

матричным спектрофотометрическим детектором (ДМД). Метод основан на определении индивидуальных антоцианинов путем их разделения на твердом носителе С18, привитом на высокочистую силикагелевую основу по обращенно-фазовому механизму с последующим фотометрическим детектированием при длине волны 520 нм. В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую колонку длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненную обращенной фазой – октадецилсиликагелем С18, размером частиц 5 мкм, в качестве подвижной фазы А – водный раствор орто-фосфорной кислоты (рН 2,0), подвижной фазы Б – ацетонитрил. Пробоподготовку образцов проводили следующим образом. 0,5 образца помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 40 мл 60% водного метанола. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее образец доводили до метки 60% водным метанолом и перемешивали. Аликвоту образца 1,5 мл центрифугировали в течение 5 мин при 15000 об/мин. Надосадочную жидкость (супернатант) переносили в вialу вместимостью 0,5 мл и помещали в автосемплер.

Обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения ChemStation for LC 3D Systems версии В.04.03.

2.2.7 Определение состава и содержания углеводов³

Качественный и количественный анализ углеводного состава проводили методом обращенной-фазовой ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием с использованием хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) и колонки хроматографической для ВЭЖХ Sugar-Pak (WATERS, США), длиной 300 мм и внутренним диаметром 6,5 мм, наполненной микрокристаллическим катионообменным гелем в кальциевой

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

форме. Для свободных сахаров режим элюирования – изократический (ПФ – вода очищенная с добавлением Са-ЭДТА 0,05 мг/мл). Скорость потока – 0,5 мл/мин, t колонки= 80 °С. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Пробоподготовку проводили следующим образом. Точную навеску образца помещали в стакан, добавляли экстрагент в соответствии с таблицей 1. Стакан помещали на магнитную мешалку с подогревом и проводили экстракцию/растворение при постоянном перемешивании при температуре 80 С.

Таблица 1 – Подготовка образцов для анализа

Образец	Экстракция/растворение
1 – Ягоды черники сухие, лиофилизированные	Экстракция горячей водой (в течение 40 мин), соотношение сырья/экстрагент 1:50
2 – Концентрат полифенолов ягод, сорбированных на гречневой муке	Экстракция горячей водой (в течение 40 мин), соотношение сырья/экстрагент 1:50

После этого 15 мл полученного раствора центрифугировали в течение 20 мин со скоростью 4500 об/мин. Отбирали 1 мл надосадочной жидкости и помещали в вials для хроматографирования и проводили анализ.

2.2.8 Определение содержания 20-гидроксиэкдизона⁴

Содержание 20-гидроксиэкдизона (20Е) в образцах определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) с масс-детектором Bruker maxis impact с электроспрейным источником ионизации на колонке Agilent Technologies Zorbax SB-C18 0,5*150 мм, 5 мкм [160]. Перед анализом к 20 мг исследуемого образца добавляли 4 мл 50% раствора метанола в воде. Перемешивали на вортексе в течение 10 секунд. Отбирали 40 мкл и добавляли к ним 1960 мкл 50% раствора метанола. Перемешивали на вортексе в течение 10 секунд и центрифугировали с относительной силой

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

центрифугирования 18407 g в течение 5 минут. В качестве стандарта использовали коммерческий 20E из *Arachnoides C. B. Clarke* (содержание вещества $\geq 98\%$, J&K Scientific GmbH, Германия). В качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты, подвижной фазы Б – ацетонитрил. Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Compass DataAnalysis версии 4.1 (Bruker Daltonik), Microsoft Excel (Microsoft).

2.3. Препаративное получение и характеристика объектов исследования

2.3.1 Получение концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1)

Процесс сорбции полифенолов из водных растворов экстракта листьев черники на гречневой муке вели при постоянном перемешивании смеси на магнитной мешалке 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).

Зависимость сорбции полифенолов на гречневой муке от рН смеси определяли, используя навеску муки 1 г в смеси с 50 мл 0,5% раствора экстракта в интервале рН 2,0-7,0 в течение 30 минут при температуре 25°C. Зависимость сорбции от продолжительности перемешивания смеси определяли с использованием 0,5% раствора экстракта во временном интервале 15-90 мин при рН 3,6, температуре 25°C, используя навеску муки 1 г. Зависимость сорбции от температуры смеси определяли, используя навеску муки 1 г в смеси с 50 мл 0,5% раствора экстракта при рН 3,6 в течение 30 минут в интервале температур 25-50°C. Зависимость сорбции от

концентрации раствора экстракта определяли в интервале 0,5-2,5% при температуре 25°C, рН 3,6 в течение 30 мин, используя навеску муки 1 г. Стехиометрический анализ сорбции полифенолов на муке коричневой гречки осуществляли путем смешивания 100 мл 0,5% экстракта с различным количеством муки (1–5 г) в течение 30 мин при температуре 25°C и рН 3,6. Удельное содержание сорбированных мукой общих полифенолов, выраженное в мг-эквивалентах галловой кислоты рассчитывали по разности их содержания в исходном растворе экстракта и в супернатанте после центрифугирования. Оптимальными считали условия, при которых содержание полифенолов, сорбированных на гречневой муке, было наиболее высоким.

Для определения содержания полифенолов в составе пищевого ингредиента его навеску 0,5 г помещали во флакон вместимостью 20 мл, сорбированные полифенолы элюировали 8 мл 1% раствора ледяной уксусной кислоты в 80% этаноле в ультразвуковой ванне «Сапфир – 2,8 ТТЦ» (ООО «Сапфир», Россия) в течение 5 мин при 55°C. Смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин и супернатант переносили в грушевидную колбу. Элюирование в том же режиме повторяли еще дважды. Элюаты объединяли и спирт выпаривали на роторном испарителе ИР1М3 (ОАО «Химлаборприбор», Россия) при 60°C до достижения 15% от исходного объема объединенных элюентов. Полученный концентрат переносили в мерный цилиндр, дистиллированной водой доводили объем до 50 мл. В полученном растворе определяли содержание общих полифенолов.

2.3.2 Получение концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2)

Экстракт ягод черники получали следующим образом. 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 в течение 30 мин (центрифуга Beckman J-6B, США) и отбирали супернатант. К осадку повторно добавляли 75% этиловый спирт в соотношении 1 г/10 мл, перемешивали в течение 1 часа, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Супернатанты, полученные на обеих стадиях выделения, объединяли и концентрировали на установке обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным «УРФ-1812» (Владисарт, РФ), после чего удаляли спирт на роторном испарителе. Содержание полифенолов в экстракте после концентрирования на установке обратного осмоса составляло $21,3 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/мл экстракта. Для получения пищевого ингредиента - концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на гречневой муке, экстракт ягод разводили дистиллированной водой до достижения концентрации общих полифенолов $13,1 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/мл экстракта для снижения его вязкости.

Условия сорбции полифенолов из ягод черники были определены на основании экспериментов по подбору оптимальных условий сорбции полифенолов из экстракта листьев черники (раздел 2.3.1), с поправкой на отличия в полифенольном составе между этими двумя объектами.

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.

2.3.3 Получение концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3)

Экстракцию фитоэкдистероидов, представленных мажорным экдистероидом 20-гидроксиэкдизоном (20E), и флавоноидов из размолотого и просеянного зерна 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. Содержание 20Е в экстракте составило $255,3 \pm 2,5$ мкг/мл, содержание флавоноидов – $477,3 \pm 1,1$ мкг/мл.

Получение пищевого ингредиента 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.

2.4 Экспериментальные животные

В экспериментах *in vivo* использовались молодые половозрелые мышисамцы линии C57Bl/6 (145 животных, возраст 5 недель) и молодые половозрелые крысы-самцы стока линии Вистар (72 животных, возраст 5 недель). Животные получены из питомника лабораторных животных Филиал "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Исследования на животных выполнены в соответствии с требованиями, изложенными в Национальных стандартах РФ ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и ГОСТ 33216—2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных,

используемых в экспериментах и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004 г). На основании этической экспертизы планируемых в диссертационной работе исследований на лабораторных животных Комитетом по этике ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» принято решение одобрить проведение исследований (Протокол №10 от 27.09.2017, Протокол №1 от 22.01.2019). Мыши содержались по 4 особи в клетке, крысы по 2 особи. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-60%, 12 часовой цикл освещения).

2.5 Биохимические методы исследования

2.5.1 Определение концентрации гликированного гемоглобина в крови мышей

Для определения гликированного гемоглобина кровь отбирали непосредственно в пробирку с заранее добавленным антикоагулянтом. Содержание гликированного гемоглобина определяли спектрофотометрически с использованием коммерческого набора «Гликогемотест» (ЭЛТА, Россия). Метод основан на принципе аффинного разделения гликированной и негликированной фракции гемоглобина гемолизата крови на сорбенте с привитой 4-аминометилфенилбороновой кислотой.

2.5.2 Определение концентрации лептина в крови мышей

В плазме крови мышей ИФА «сэндвич»-методом определяли содержание лептина с использованием коммерческих наборов реактивов (RayBiotech, США и BioVendor, Чехия). Для проведения анализа использовали специальную планшету, в которой стенки лунок покрыты специфичными для лептина мышей антителами. В лунки вносятся растворы

стандартов и образцы плазмы. Лептин, присутствующий в образцах, связывается с антителами. Лунки промываются и вносятся биотинилированные антитела к лептину мышей. После вымывания несвязанных биотинилированных антител, в лунки вносится стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Лунки повторно промываются и в них вносят ТМБ (тетраметилбензидиновый) субстрат и после него стоп реагент. Измеряется оптическая плотность при длине волны 450 нм. Раствор приобретает окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству связанного лептина.

2.5.3 Определение концентрации грелина в крови мышей

В плазме крови мышей ИФА конкурентным методом определяли содержание грелина с использованием коммерческого ИФА набора по инструкции производителя (RayBiotech, США). В исследуемые образцы и стандарты вносятся биотинилированный пептид грелина. После этого образцы и стандарты переносятся в планшету, где биотинилированный грелин «соревнуется» с эндогенным (немеченым) грелином за связывание с антителами к грелину. После промывки, связанный биотинилированный грелин взаимодействует с стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена, что катализирует реакцию окрашивания. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству связанного биотинилированного грелина и обратно пропорциональна количеству эндогенного грелина в образцах и стандартах. Измеряется оптическая плотность при длине волны 450 нм. Содержание грелина в образцах определяется по стандартной кривой.

2.5.4 Определение концентрации инсулина в крови мышей

Содержание инсулина в плазме крови мышей определяли «сэндвич»-методом с использованием коммерческого набора реактивов (Alpco, США). Для проведения анализа использовали планшету, лунки которой покрыты моноклональными антителами специфичными к инсулину. Стандарты, контроли и исследуемые образцы вносятся в лунки вместе с конъюгатом. Затем планшета инкубируется при комнатной температуре на шейкере при 700-900 об/мин. После первой инкубации лунки промываются и в них вносят ТМБ субстрат. Планшету повторно инкубируют при комнатной температуре на шейкере при 700-900 об/мин. После второй инкубации в лунки вносится стоп реагент, измеряется оптическая плотность при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию инсулина в образцах.

2.5.5 Определение показателей липидного обмена в печени мышей

Содержание триглицеридов (ТГ) и холестерина (ХС) в жире, экстрагированном из печени, определяли спектрофотометрически на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 20i (ThermoScientific, США).

Жир экстрагировали из печени по методу Фолча следующим образом [57]. Навески лиофилизованной печени измельчали в ступке и переносили в пробирки. К навескам добавляли смесь хлороформа с метанолом (2:1) в соотношении 1/10. Образцы перемешивали в течение 1,5 часов, затем дополнительно вносили дистиллированную воду в объеме 1/3 от объема растворителя, после чего смесь центрифугировали при 3500 об/мин в течение 5 мин. Жир, растворенный в хлороформе, который оседал на дне пробирки, отбирали в предварительно взвешенные колбы. После этого в пробирки добавляли хлороформ в объеме 1/3 от исходного объема растворителей,

центрифугировали при 3500 об/мин в течение 5 мин и повторно переносили в колбы жир, растворенный в хлороформе. Получившиеся объединенные экстракты жира упаривали на роторном испарителе до полного удаления хлороформа. Колбы с осевшим на стенках жиром помещали в муфельную печь при 80°C на 15 мин. После остывания, колбы взвешивали и по разнице с исходной массой определяли массу экстрагированного жира. Перед анализом, навеску жира предварительно растворяли в 95% этаноле в концентрации 2,5 мг/мл.

2.5.6 Определение концентрации кортикостерона в крови крыс

Содержание кортикостерона в сыворотке крови крыс определяли методом конкурентного ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (IDS limited, Великобритания). Для анализа используется планшета, лунки которой покрыты поликлональными антителами к кортикостерону. В лунки вносятся калибраторы, контроли и исследуемые образцы совместно с кортикостероном, меченым пероксидазой хрена. Планшета инкубируется в течение ночи при 2-8°C. После этого лунки промываются и проводится реакция окрашивания с помощью ТМБ субстрата. Измеряется оптическая плотность при длине волны 450 нм. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации кортикостерона.

2.5.7 Общий биохимический анализ крови крыс⁵

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,

⁵ Выполнено совместно с инженером-исследователем 1-й категории лаборатории метаболомного и протеомного анализа к.м.н. Сото С.Х.

холестерин ЛПНП, триглицериды), пуринового обмена (мочевая кислота), минерального обмена (фосфор, магний, кальций), функционального состояния печени (общий билирубин, АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза) и уровень глюкозы.

2.5.8 Определение концентрации простагландина E2 в моче крыс

Содержание простагландина E2 в моче крыс определяли методом ИФА с использованием коммерческого набора реактивов (R&D systems, США).

Принцип метода основан на конкурентном связывании простагландина E2 в исследуемых образцах и простагландина E2 меченого пероксидазой хрена с ограниченным числом моноклональных антител. Связывание простагландина, содержащегося в образцах, с антителами происходит во время первой инкубации. Во время второй инкубации со свободными антителами связывается простагландин, меченый пероксидазой хрена. После промывки для удаления несвязанных компонентов, в лунки вносится раствор субстрата для определения активности связанных ферментов. Происходит реакция окрашивания, оптическую плотность измеряют при длине волны 450 нм. Интенсивность окрашивания обратно пропорциональна концентрации простагландина E2 в образцах.

2.5.9 Определение уровня катехоламинов в моче крыс⁶

Содержание катехоламинов - норадреналина, адреналина и дофамина – в моче определяли методом ВЭЖХ согласно [14]. Подготовку образцов проводили следующим образом: 5 мл мочи центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин, доводили pH до 8,5 с помощью 1,0 М Трис-HCl буфера (pH 8,6) и добавляли в мочу 40 мкл раствора внутреннего стандарта –

⁶ Выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории пищевых биотехнологий и специализированных продуктов к.б.н. Зориным С.Н.

3,4-дигидробензиламин гидробромида (Sigma-Aldrich, США). Далее образцы мочи наносили на микроколоники (0,5*1,0 см) с оксидом алюминия в качестве сорбента. Сорбент промывали дистиллированной водой (дважды по 2 мл); катехоламины и 3,4-дигидробензиламин гидробромид элюировали 1,0 М раствором уксусной кислоты. Элюент пропускали через хроматографическую колонку (Nucleodur C18, 5 микрон, 250 × 5 мм), предварительно откалиброванную по внутреннему стандарту. Состав подвижной фазы – 0,1 М фосфатно-цитратный буфер (рН 4,0), содержащий 50 мг/л ионно-парного реагента (натриевая соль 1-октансульфоновой кислоты для ВЭЖХ, Dudley Chemical, США) и 2,5% ацетонитрил (чистота «для ВЭЖХ»). Объем вкалываемого образца – 100 мкл. Скорость элюирования 1,0 мл/мин. Использовался амперометрический детектор (Химавтоматика, Москва, Российская Федерация) со стеклоуглеродным электродом и рабочим напряжением +1,0 В.

2.6 Физиологические методы исследования

2.6.1 Измерение уровня глюкозы крови

Для прижизненного определения динамики концентрации глюкозы в течение эксперимента у животных отбирали кровь из хвостовой вены, уровень глюкозы определяли с помощью портативного электрохимического глюкометра («OneTouch Select», США).

2.6.2 Определение нарушения толерантности к глюкозе в пероральном глюкозотолерантном тесте

Для определения нарушения толерантности к глюкозе применяется пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ). При проведении ПГТТ животным всех экспериментальных групп вводили 30% раствор глюкозы в дозе 2 г/кг массы тела. Объем введения определялся индивидуально для

каждого животного, учитывая последнее значение массы тела. Отбирали кровь для определения уровня глюкозы до введения 30% раствора глюкозы (0 точка) через 30, 60, 120, 180, 240 мин. Строили кривые зависимости уровня глюкозы от времени после введения глюкозной нагрузки, определяли значение площади под кривой (ППК ммоль/л*240 мин).

2.6.3 Определение чувствительности тканей к инсулину в тесте на инсулинорезистентность

Для определения чувствительности тканей к инсулину применяется тест на инсулинорезистентность (ИРТ). Животным всех экспериментальных групп вводили инсулин внутривенно в дозе 0,25 U/кг массы тела. Объем введения определялся индивидуально для каждого животного, учитывая последнее значение массы тела. Измеряли уровень глюкозы крови через 30, 60, 120, 180, 240 минут. Строили кривые зависимости уровня глюкозы от времени после введения инсулина, определяли значение площади под кривой (ППК ммоль/л*240 мин).

2.6.4 Оценка общей двигательной активности, исследовательского поведения и эмоциональности в тесте Открытое поле

В тесте Открытое поле (ОП) животное помещают в незнакомое открытое пространство, из которого оно не может выбраться. Незнакомая среда запускает сложный набор поведенческих реакций, отражающих тревожность и стремление исследовать новую территорию, т.е. поведение животного в ОП определяется соотношением оборонительных и исследовательских тенденций.

Установка ОП представляет собой квадратную арену с длиной стороны 100 см, окруженную непрозрачными стенками высотой 40 см. Разметка арены для проведения теста ОП представлена на рисунке 6:



Примечание – серым цветом выделена зона периферии.

Рисунок 6 – Разметка арены для проведения теста ОП

Тестирование проводили в стандартных условиях освещенности, в течение 3 минут (180с). В ходе тестирования регистрировали следующие поведенческие показатели: количество пересеченных зон, время, проведенное в каждой зоне, пройденную дистанцию. Перемещение животных по полю регистрировали с помощью системы видеонаблюдения «Smart 3.0.04» («Panlab Harvard Apparatus», Испания).

2.6.5 Оценка уровня тревожности в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт

В тесте Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ) изучали поведение животных в условиях переменной стрессогенности, т.е. при свободном выборе комфортных условий, что позволяет оценить их уровень тревожности. Оценка поведения в данном тесте основана на естественном стремлении животного оставаться в закрытых (темных) местах и природном страхе к открытым пространствам и высотам (рис. 7). Данный тест позволяет

оценить степень выраженности эмоциональной реакции страха и тревоги, двигательную активность, скорость ориентировочных реакций.

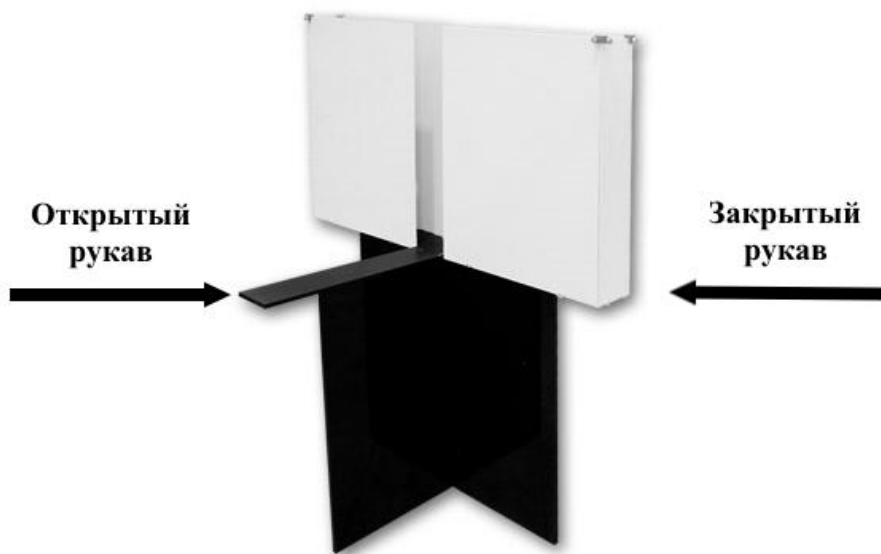


Рисунок 7 – Установка Приподнятый крестообразный лабиринт

Время пребывания мыши в лабиринте составляло 5 мин. При тестировании регистрировали число заходов и время пребывания в закрытых (ЗР) и открытых рукавах (ОР) лабиринта, число перемещений между зонами лабиринта и общую пройденную дистанцию. Перемещение мышей по лабиринту регистрировали с помощью системы видеонаблюдения «Smart 3.0.04» («Panlab Harvard Apparatus», Испания).

2.6.6 Оценка краткосрочной и долгосрочной памяти в тесте Условный рефлекс пассивного избегания

Краткосрочную и долгосрочную память животных оценивали в тесте Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ), используя установку черно-белая камера. Установка представляет собой два отсека, соединенных вертикальной дверцей: большой светлый отсек и малый темный, пол которого электрифицирован (рис. 8). При обучении животное однократно помещали в светлый отсек камеры спиной к темному отсеку. Под влиянием

исследовательского поведения и врожденного предпочтения темных участков пространства (фотофобии) грызуны достаточно быстро заходили в темный отсек. Регистрировали латентный период (ЛП) пребывания в светлом отсеке камеры. Как только животное переходило в темный отсек камеры, оно получало электрокожное раздражение на лапы (ток 0,2 мА не более 8 сек.). Затем его сразу же переводили в жилую клетку.



Рисунок 8. Установка черно-белая камера

Через 24 часа после обучения у животных проверяли сохранность памятного следа – краткосрочную память. Для этого их тестировали в той же камере, но без подачи тока. Животное помещали в светлый отсек камеры в стартовое положение и фиксировали ЛП нахождения в светлом отсеке до его перехода в темный. ЛП пребывания в светлом отсеке камеры при тестировании является показателем, характеризующим степень запоминания животным отрицательного опыта – удара током, который оно приобрело в темном отсеке камеры во время первого его посещения при обучении. Если животное не переходило в темный отсек камеры в течение 180 с, то считалось, что памятный след полностью сохранен. С целью оценки влияния экспериментальных рационов на процессы забывания (долгосрочную память) тестирование сохранения памятного следа проводили спустя отдаленный интервал времени – 2-3 недели.

2.6.7 Оценка статического компонента выносливости в тесте Сила хватки

Оценку статического компонента выносливости животных проводили с помощью определения силы хватки передних лап. Измерение проводили с помощью динамометра (рис. 9, Bioseb, Германия). Силу хватки определяли в граммах, замеряя максимальные показания динамометра (в тот момент, когда животное отцепляется от рамки).

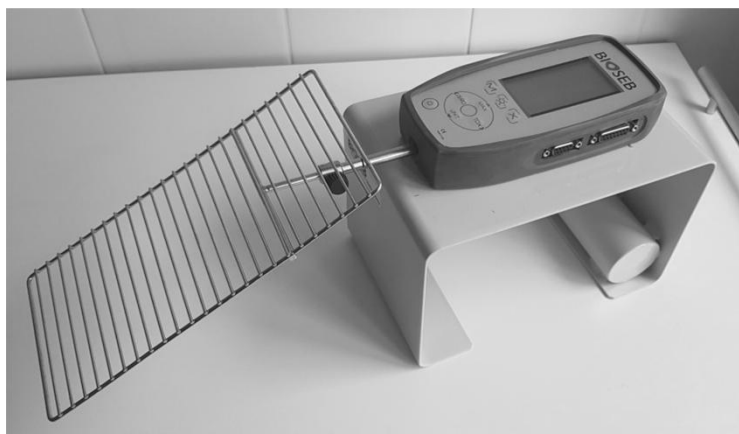


Рисунок 9 – Динамометр с рамкой для измерения силы хватки

2.7 Биологические модели

2.7.1 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). В состав ВЖВУ рациона входит 22,5% белка, 30% жира, 18% углеводов в виде крахмала и 20% сахарозы (табл. 2). Общая калорийность рациона составляет 493 ккал/100 г.

Таблица 2 – Состав стандартного рациона и ВЖВУ рациона

№	Компоненты	Содержание на 100 г корма, г	
		Стандартный полусинтетический рацион	ВЖВУ рацион
1	Казеин (содержание белка 90%)	25,0	25,0
2	Жировая композиция	Подсолнечное масло (г)	5,0
		Лярд (г)	25,0
3	Крахмал (г)	58,0	18,0
4	Сахароза	-	20,0
5	Минеральная смесь* (г)	4,0	4,0
Дополнительно вводили:			
6	ж/р витамины** (мл)	1,0	1,0
7	в/р витамины*** (г)	0,1	0,1
Калорийность, ккал		362±2	493±3

Примечание -

* Состав минеральной смеси (г на 1 кг смеси): натрий хлористый NaCl – 139; калий фосфорно-кислый однозамещенный K₂HPO₄ – 388,8; магний сернокислый гидрат MgSO₄·7H₂O – 57,4; кальций углекислый CaCO₃ – 381,4; железо(II) сернокислое FeSO₄·7H₂O – 26,4; йодистый калий KI – 0,77; марганец сернокислый MnSO₄·2H₂O – 4,45; медь сернокислая гидрат CuSO₄·5H₂O – 0,48; кобальт хлористый гидрат, CoCl₂·6H₂O – 0,024; фтористый натрий NaF – 0,5; алюминиевокалиевые квасцы AlK(SO₄)₂·12H₂O – 0,11.

** Состав раствора жирорастворимых витаминов (в мл на 100 мл раствора): витамин Е (α-токоферол 50 мг/мл) – 10; витамин А (ретинол 100 000 и.е./мл) – 0,8; витамин Д (холекальциферол 50 000 и.е./мл) – 1,4; подсолнечное масло до 100 мл

*** Состав смеси водорастворимых витаминов (мг на 100 г смеси): В1 – 500; В2 – 500; В6 – 500; пантотенат кальция – 2800; никотиновая кислота – 2000; фолиевая кислота – 200; В12 – 4; викасол – 100; глюкоза – 93600.

Содержание витаминов и минеральных веществ в корме соответствует международным стандартам и позволяет полностью обеспечить все физиологические потребности животных.

Данная общепринятая модель является легко воспроизводимой и эффективно используется для индуцирования состояний характерных для таких заболеваний, как метаболический синдром, ожирение, диабет [34, 75]. Потребление данного рациона может приводить к повышению кровяного давления, глюкозы в крови, резистентности к инсулину, гиперлипидемии и иным нарушениям метаболизма.

2.7.2 Моделирование стрессорного воздействия путем принудительной иммобилизации

Иммобилизационный стресс моделировали путем помещения животных в прозрачные домики-фиксаторы (ООО «Открытая наука», Россия), ограничивающие свободу движения (рис. 10).

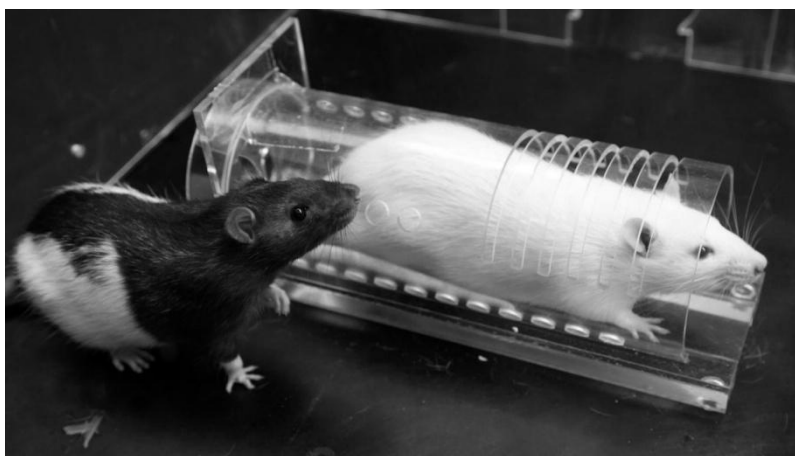


Рисунок 10 – Домик-фиксатор для принудительной иммобилизации

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. В процессе теста велось постоянное наблюдение за состоянием животных. Сразу после иммобилизации крыс помещали в индивидуальные обменные клетки для сбора суточной мочи.

Иммобилизация является традиционной моделью стресса, при которой помимо ограничения движения присутствует выраженный эмоциональный компонент, связанный с невозможностью избежать угрожающей ситуации [130].

2.7.3 Моделирование стрессорного воздействия посредством истощающей физической нагрузки

Для моделирования стрессорного воздействия посредством истощающей физической нагрузки используется беговая дорожка. Беговая

дорожка оснащена 5 беговыми лентами с регулируемой скоростью (0-150 см/с) и наклоном (от -25° до 25°) (PanLab, Испания). Животные принуждаются к бегу с помощью электрического тока при помощи электрода, помещенного в нижнем конце дорожки (ток может устанавливаться от 0 до 2 мА). Регистрируемые параметры: пройденная дистанция, число полученных электрических ударов, общее время ударов. Общий вид установки представлен на рис. 11.

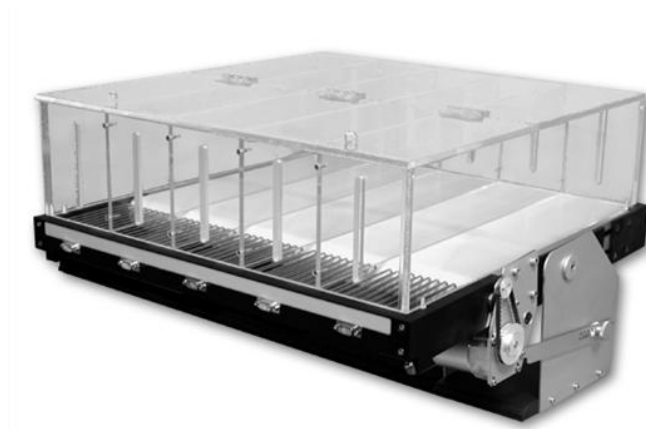


Рисунок 11 – Беговая дорожка Treadmill

Перед началом эксперимента проводили предварительное разделение животных на обучаемых и необучаемых бегу. Необучаемые крысы были отбракованы из исследования.

Тренировочные тесты на Беговой дорожке проводили 1 раз в неделю. Продолжительность нагрузки на стадии тренировок составила 10 мин, скорость движения ленты – 16-22 см/с, наклон полотна - 0° . Согласно [119], при использовании беговой дорожки для проведения истощающей физической нагрузки, необходимо проводить предварительные тренировки животных при низкой скорости, малой продолжительности и отсутствии наклона, для того чтобы избежать непреднамеренных травм.

Истощающую физическую нагрузку проводили при следующих условиях: продолжительность нагрузки составила 50 мин, скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна составил 10° . Сразу

после бега животных помещали в индивидуальные обменные клетки для сбора суточной мочи.

2.8 Дизайны экспериментов in vivo

2.8.1 Эксперимент 1. Сравнительная физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона

Эксперимент проведен на мышах-самцах линии C57Bl/6 (61 животное). Мыши содержались по 4 особи в клетке в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-60%, 12 часовой цикл освещения).

Исходная масса тела животных на начало эксперимента составила 20±2г. Продолжительность эксперимента – 130 суток.

До проведения эксперимента кормления у животных оценивали уровень глюкозы крови (животных депривировали голодом 4 часа) и состояние углеводного обмена натощак, определяя ППК (ммоль/л*240 мин) в глюкозотолерантном тесте (ПГТТ).

Животные рандомизированно (по массе тела, уровню глюкозы и показателю ППК) были разделены на 4 группы: контрольную группу К1 (n=10 мышей), вторую контрольную группу К1а (n=25) и 2 опытные группы Г3 и Г4 (n=13). Результаты предварительного распределения представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Предварительное распределение животных по группам

Показатель	Группа животных			
	К1	К1а	Г3	Г4
Масса тела, г	20,2±0,5	20,1±0,6	19,8±0,5	20,0±0,3
Уровень глюкозы, ммоль/л	8,3±0,6	8,1±0,3	8,5±0,4	8,0±0,3
ППК, ммоль/л*240	1402±128	1466±103	1587±136	1533±98

Животные контрольной группы К1 на протяжении всего эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [120]. Животные групп К1а и Г3, Г4 получали модифицированный изоазотистый высокожировой высокоуглеводный рацион (ВЖВУ рацион). В рацион животных группы Г3 вносили пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5г/100г рациона и в рацион опытной группы Г4 вносили пищевой ингредиент 1 в количестве 5г/100г рациона. Состав рационов представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Состав полусинтетических рационов

№	Компоненты	Содержание на 100 г корма, г				
		К1	К1а	Г3	Г4	
1	Казеин	25,0	25,0	25,0	25,0	
3	Жировая композиция	Подсолнечное масло (г)	5,0	5,0	5,0	5,0
		Лярд (г)	5,0	25,0	25,0	25,0
4	Крахмал (г)	58,0	18,0	15,5	13,0	
5	Сахароза	-	20,0	20,0	20,0	
6	Пищевой ингредиент 1	-	-	2,5	5,0	
7	Минеральная смесь* (г)	4,0	4,0	4,0	4,0	
Дополнительно вводили:						
8	ж/р витамины** (мл)	1,0	1,0	1,0	1,0	
9	в/р витамины*** (г)	0,1	0,1	0,1	0,1	
Калорийность, ккал		362±2	493±3	493±3	493±3	

Примечание -

* Состав минеральной смеси (г на 1 кг смеси): натрий хлористый NaCl – 139; калий фосфорно-кислый однозамещенный K₂HPO₄ – 388,8; магний сернокислый гидрат MgSO₄·7H₂O – 57,4; кальций углекислый CaCO₃ – 381,4; железо(II) сернокислое FeSO₄·7H₂O – 26,4; йодистый калий KI – 0,77;

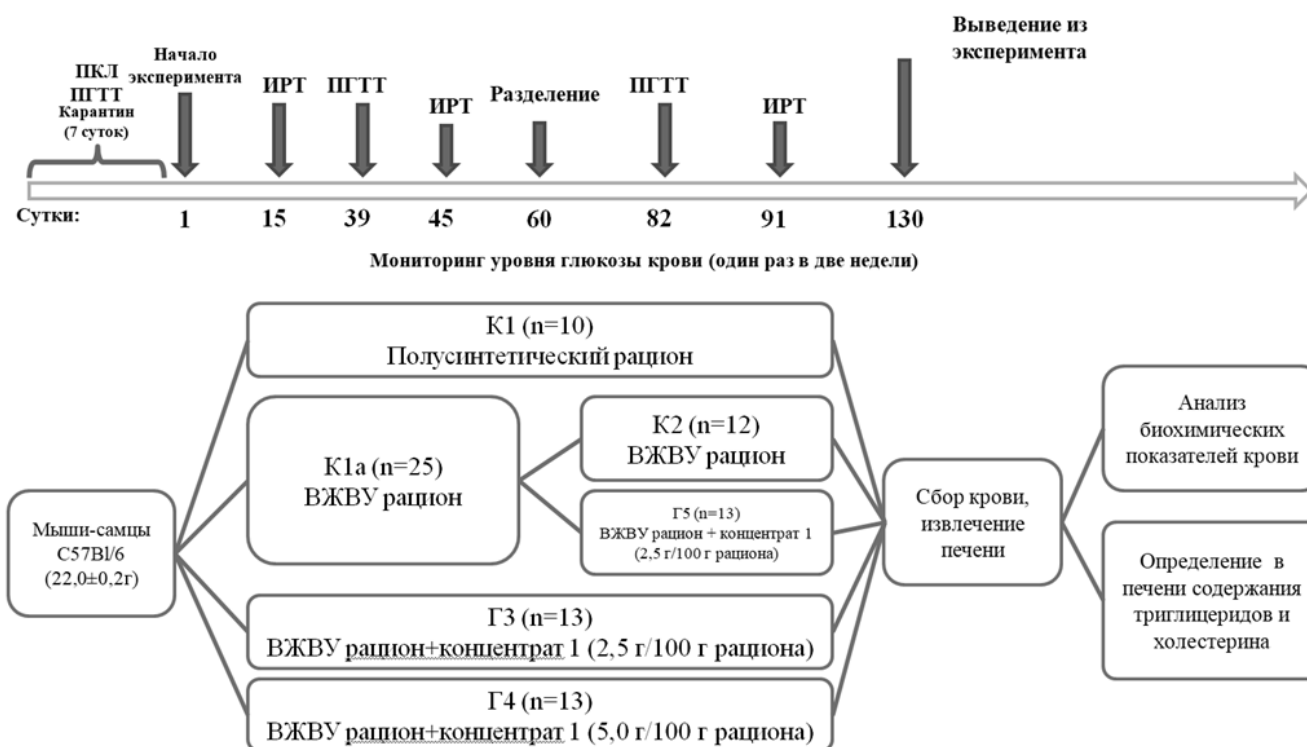
марганец сернокислый $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ – 4,45; медь сернокислая гидрат $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,48; кобальт хлористый гидрат, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,024; фтористый натрий NaF – 0,5; алюминиовокалиевые квасцы $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ – 0,11.

** Состав раствора жирорастворимых витаминов (в мл на 100 мл раствора): витамин Е (α -токоферол 50 мг/мл) – 10; витамин А (ретинол 100 000 и.е./мл) – 0,8; витамин Д (холекальциферол 50 000 и.ед/мл) – 1,4; подсолнечное масло до 100 мл

*** Состав смеси водорастворимых витаминов (мг на 100 г смеси): В1 – 500; В2 – 500; В6 – 500; пантотенат кальция – 2800; никотиновая кислота – 2000; фолиевая кислота – 200; В12 – 4; викасол – 100; глюкоза – 93600.

Животные всех групп на протяжении всего эксперимента получали питьевую воду (фильтруемую системой MilliRO) *ad libitum*.

На 60 сутки экспериментального моделирования признаков нарушений углеводного и липидного обмена группа К1а была разделена на две новые группы: ВЖВУ контрольную группу К2 и новую опытную группу Г5. В рацион группы Г5 дополнительно вносили пищевой ингредиент 1 в количестве 2,5 г/100 г рациона, для оценки эффектов потребления пищевого ингредиента при развившихся нарушениях углеводного обмена. Кормление животных экспериментальными рационами продолжалось еще в течение 70 суток (рис. 12).



Примечание – ИРТ – тест на инсулинорезистентность, ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест, тест ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт, тест УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания.

Рисунок 12 – Дизайн эксперимента №1.

Три раза в неделю контролировали потребление корма, раз в неделю производили взвешивание животных. Один раз в две недели у животных измеряли уровень глюкозы в крови. На 39 и 82 сутки проводили ПГТТ. На 15, 45 и на 91 сутки проводили ИРТ. Оценку уровня тревожности и двигательной активности животных проводили, используя ПКЛ. Первое тестирование животных проводили на 40 сутки, второе тестирование проводили на 90 сутки эксперимента. Оценку поведения и памяти животных проводили с использованием теста УРПИ. Обучение проводили на 49 сутки эксперимента, проверку обучения (краткосрочная память) на 50 сутки эксперимента и оценку долгосрочной памяти проводили на 70 сутки периода кормления. На 130 сутки животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом. Кровь отбирали для определения содержания

гликированного гемоглобина, лептина, грелина. После декапитации у животных извлекали печень, лиофилизовали и гомогенизировали. В гомогенатах печени определяли содержание триглицеридов, холестерина.

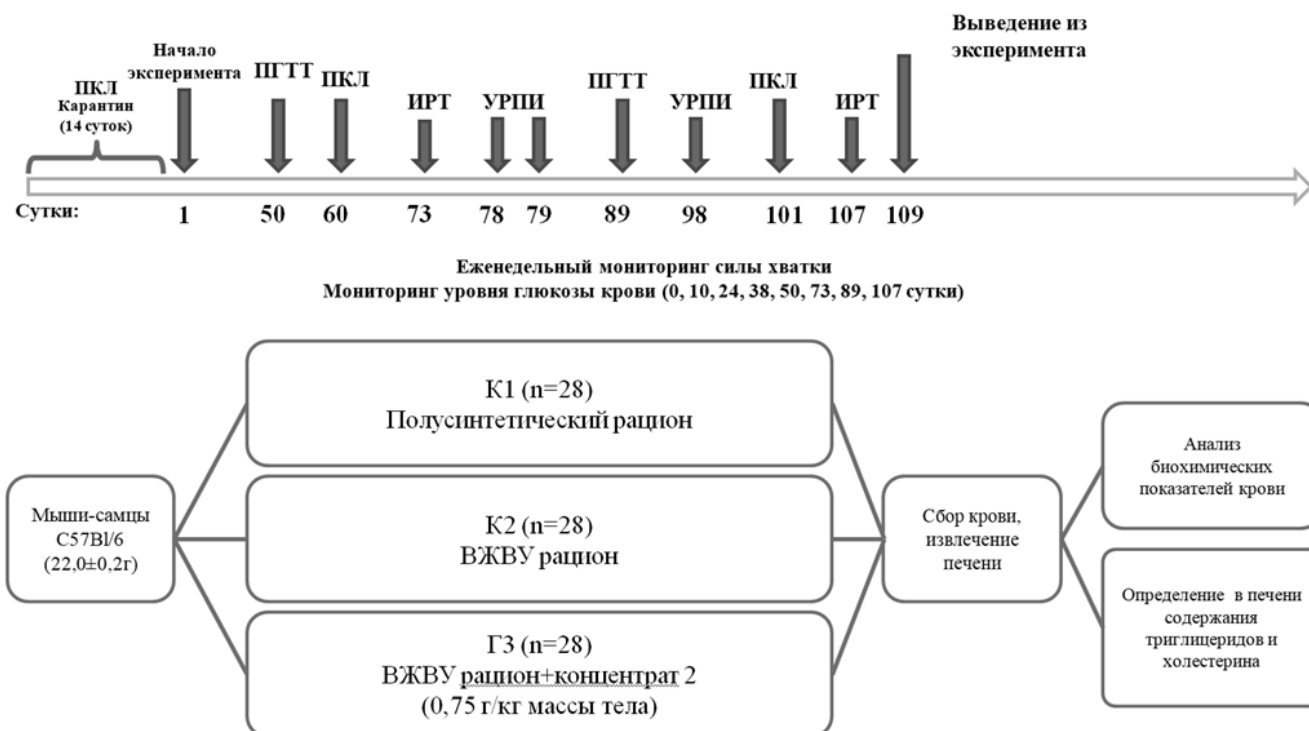
2.8.2 Эксперимент 2. Изучение и физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона

Эксперимент проведен на мышах-самцах линии C57Bl/6 (84 животных). Мыши содержались по 4 особи в клетке в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-26°C, относительная влажность 30-60%, 12 часовой цикл освещения). Исходная масса тела мышей на начало эксперимента составила $22,0 \pm 0,2$ г. Продолжительность эксперимента – 109 суток.

Животных рандомизированно (по массе тела, уровню глюкозы, силе хватки передних лап, результатам теста Приподнятый крестообразный лабиринт) разделили на 3 группы: контрольную группу К1 (n=28), контрольную группу К2 (n=28) и опытную группу Г3 (n=28).

Животные группы К1 на протяжении всего эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион (22,5% белка, 10% жира, 58% углеводов в виде крахмала, 362 ккал/100г) [120]. Животные групп К2 и Г3 получали модифицированный изоазотистый высокожировой высокоуглеводный рацион (ВЖВУ рацион, 22,5% белка, 30% жира, 18% углеводов в виде крахмала, 20% сахарозы, 493 ккал/100 г). В рацион животных опытной группы Г3 вносили пищевой ингредиент 2 из расчета дозы 0,75 г/кг массы тела животного. В рацион животных контрольной группы К2 дополнительно вносили эквивалентное количество гречневой

муки. Животные всех групп на протяжении всего эксперимента получали корм и питьевую воду *ad libitum* (рис. 13).



Примечание – ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест; ИРТ – инсулинорезистентный тест; УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания; ОП – открытое поле.

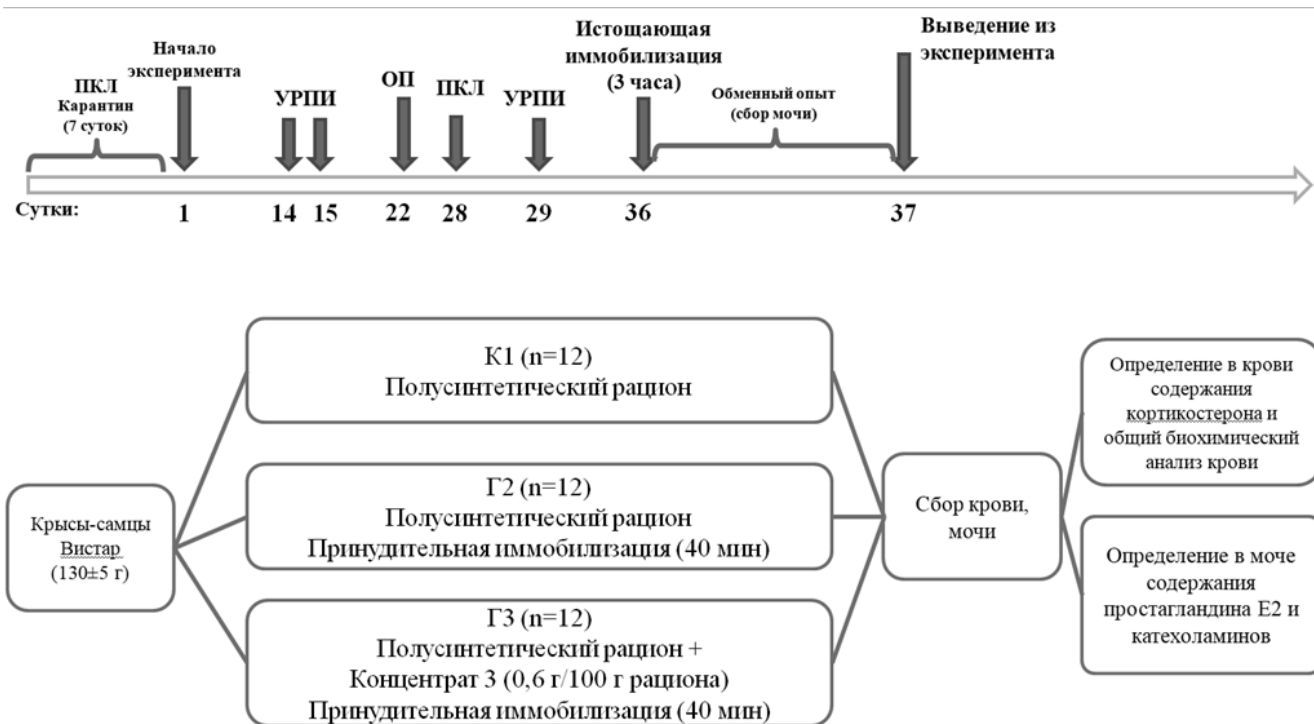
Рисунок 13 – Дизайн эксперимента №2

Три раза в неделю контролировали потребление корма, один раз в неделю производили взвешивание животных. Ежедневно у животных измеряли силу хватки передних лап. Один раз в две недели у животных измеряли уровень глюкозы в крови. На 50 и 89 сутки эксперимента проводили ПГТТ. На 73 и 107 сутки проводили ИРТ. На 60 и 101 сутки эксперимента проводили тестирование животных на приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). На 85 сутки животных тестировали на установке открытое поле (ОП). На 78,79 и 98 сутки эксперимента проводили тестирование животных в тесте условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). На 109 сутки животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом. Кровь отбирали для определения содержания гликированного гемоглобина, получали плазму для определения содержания

инсулина и лептина. После декапитации у животных извлекали печень, лиофилизировали и гомогенизировали. В гомогенатах печени определяли содержание триглицеридов, холестерина.

2.8.3 Эксперимент 3. Проведение сравнительной физиолого-биохимической оценки эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (пищевой ингредиент 3), на уровне маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар в условиях принудительной иммобилизации

Эксперимент проведен с использованием крыс-самцов линии Вистар (36 животных) с исходной массой тела 130 ± 5 г. Животных разделили на 3 группы (n=12): К1, Г2 Г3. Длительность эксперимента – 37 суток. Животные всех групп в течение эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [120]. В рацион крыс опытной группы Г3 вносили пищевой ингредиент 3 в количестве 0,6%. На 22 сутки эксперимента проводили тестирование животных в ОП. На 0 и 28 сутки проводили тестирование животных в ПКЛ. Эти тесты позволяют оценить степень тревожности животных и их общую исследовательскую активность, а комплексное использование этих тестов повышает точность получаемых результатов [27]. Процессы краткосрочной и долгосрочной памяти, а также обучаемость оценивали в тесте УРПИ. Обучение проводили на 14 сутки эксперимента – 1 день тестирования, проверку обучения (краткосрочная память) на 15 сутки эксперимента- 2 день, долгосрочную память оценивали на 29 сутки кормления (2 недели).



Примечание – ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ОП – открытое поле.

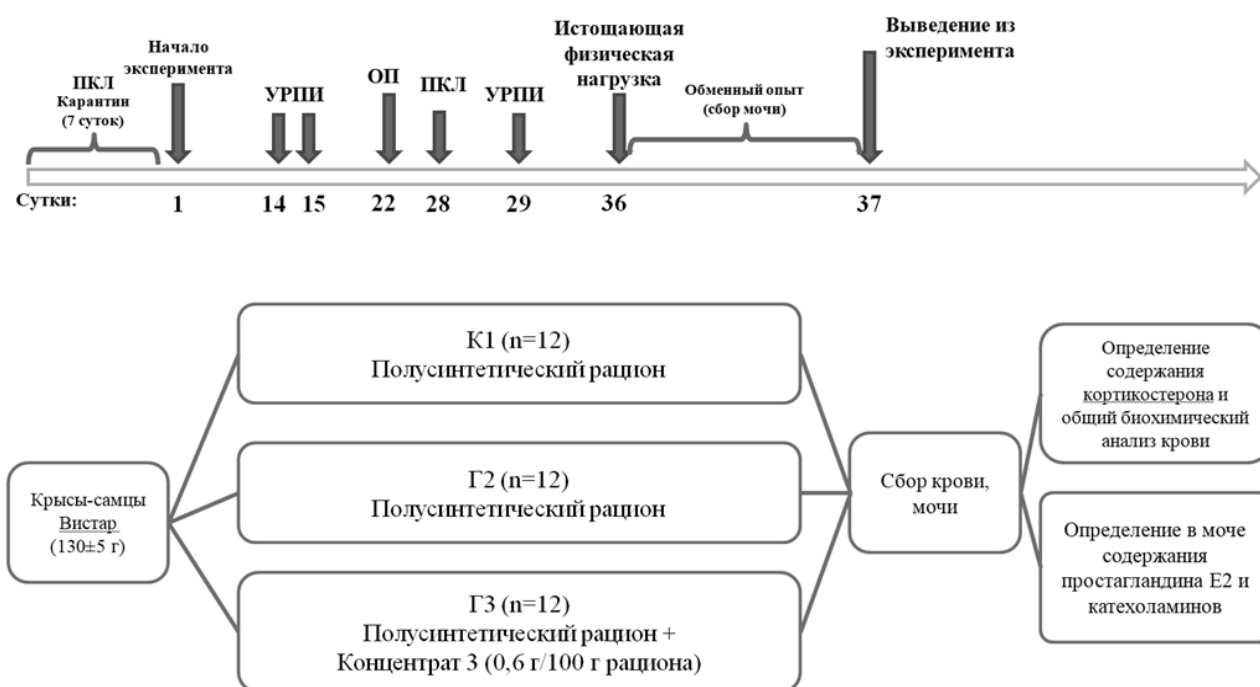
Рисунок 14 – Дизайн эксперимента №3

Животные групп Г2 и Г3 на протяжении 35 суток подвергались ежедневной 40-минутной иммобилизации, путем помещения в прозрачные домики-фиксаторы, ограничивающие свободу движения крыс. На 36 сутки эксперимента животные групп Г2 и Г3 подвергались истощающей иммобилизации в течение 3 часов. Сразу после истощающей иммобилизации животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 ч (37 сут.) крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина) в моче определяли методом ВЭЖХ. Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА. Содержание кортикостерона в сыворотке крови определяли методом ИФА. В сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе 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.

2.8.4 Эксперимент 4. Оценка *in vivo* биологических эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца (пищевой ингредиент 3) на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке

Эксперимент *in vivo* проведен с использованием крыс-самцов линии Вистар (36 животных) с исходной массой тела 130 ± 5 г. Длительность эксперимента составила 37 суток. Животных разделили на 3 группы ($n=12$): К1, Г2 и Г3. Животные всех групп в течение эксперимента получали стандартный полусинтетический рацион [120]. В рацион крыс опытной группы Г3 вносили пищевой ингредиент 3 в количестве 0,6%.



Примечание – ПКЛ – приподнятый крестообразный лабиринт; ОП – открытое поле.

Рисунок 15 – Дизайн эксперимента №4

На 36 сутки эксперимента животные групп Г2 и Г3 подвергались истощающей физической нагрузке на беговой дорожке. Средняя продолжительность бега составила 45 ± 2 мин, скорость ленты плавно повышали с 19 см/с до 43 см/с, наклон полотна 10° . Сразу после бега животных помещали в обменные клетки для сбора суточной мочи. Через 24 ч (37сут.) крыс выводили из эксперимента путем декапитации под легким эфирным наркозом. Содержание катехоламинов (норадреналина, адреналина и дофамина) в моче определяли методом ВЭЖХ. Содержание простагландина E2 в моче определяли методом ИФА. Содержание кортикостерона в сыворотке крови определяли методом ИФА. В сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе 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.

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов IBM SPSS Statistics 20 и Microsoft Excel 2007. Вычисляли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены как $M \pm m$. Статистические различия между группами оценивали с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Гранулометрическая характеристика опытного образца гречневой муки

Эффективность сорбции органических соединений различной природы на биополимерных матрицах зависит от размера частиц самой матрицы. Исходные коммерческие образцы гречневой муки характеризовались неоднородным гранулометрическим составом, что потребовало проведения дополнительного измельчения для обеспечения большей гомогенности используемой муки.

Для проведения экспериментов по оптимизации условий сорбции полифенолов ЭЛЧ на муке была получена экспериментальная партия гречневой муки, измельченной на ножевой мельнице GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия) при 8000 об/мин в течение 10 мин [118]. Средний размер частиц исходного образца муки составил $181,6 \pm 5,1$ мкм, средний размер частиц муки, прошедшей измельчение, составил $134,9 \pm 3,9$ мкм (рис. 16). Для образцов исходной муки были характерны крупные частицы с ровными краями, после измельчения преобладали мелкие частицы с ровными краями.

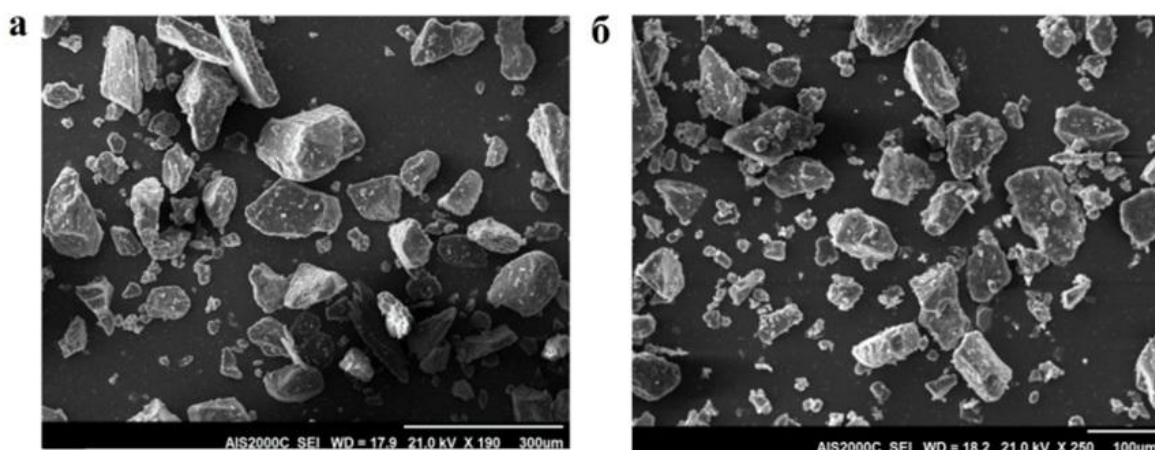


Рисунок 16 – Микрофотографии образцов гречневой муки, полученные методом растровой электронной микроскопии. а - мука до измельчения; б - мука после измельчения.

3.2 Определение оптимальных условий сорбции полифенолов на гречневой муке

С повышением рН от 2,0 до 7,0 имело место снижение средних значений сорбции полифенолов ЭЛЧ от $11,7 \pm 0,8$ мг-экв. г.к./г муки до $3,5 \pm 0,4$ мг-экв. г.к./г муки (рис. 17).

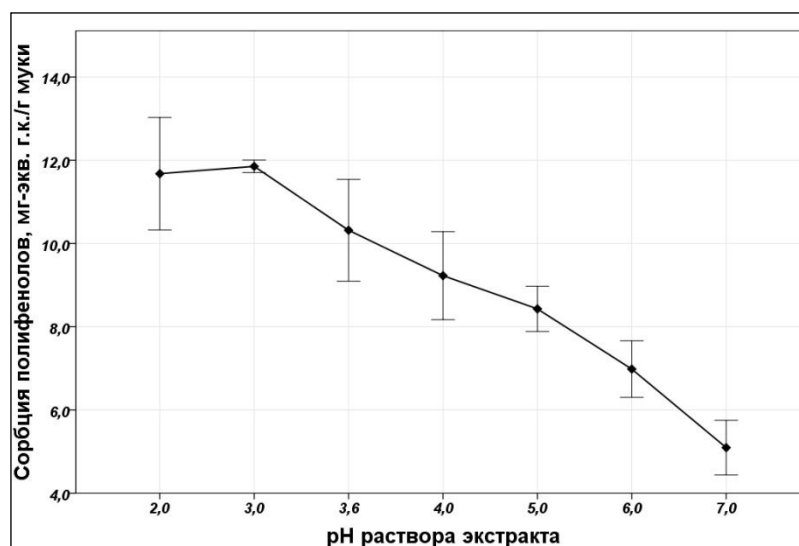


Рисунок 17 – Зависимость сорбции полифенолов экстракта листьев черники на гречневой муке от рН инкубационной смеси (0,5% р-р ЭЛЧ, навеска муки 1 г, инкубация в течение 30 мин при 25°C).

При повышении концентрации полифенолов ЭЛЧ в интервале 0,5%-2,0% наблюдалось увеличение сорбции от $12,1 \pm 0,8$ мг-экв. г.к./г муки до $26,0 \pm 1,6$ мг-экв. г.к./г муки (рис. 18). При дальнейшем повышении концентрации ЭЛЧ имело место гелеобразование, препятствующее корректной оценке процесса сорбции.

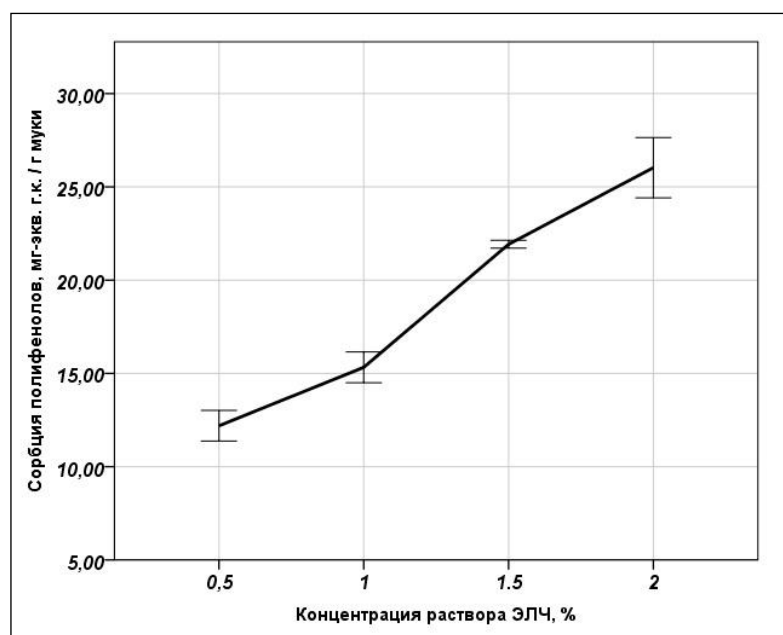


Рисунок 18 – Зависимость сорбции полифенолов (мг-экв. г.к./г муки) из раствора ЭЛЧ на гречневой муке от концентрации раствора экстракта (рН раствора ЭЛЧ 3,6, навеска муки 1 г, инкубация в течение 30 мин при 25°C).

Изменение соотношения объем раствора ЭЛЧ/масса гречневой муки от 100/1 до 20/1 также как и изменение в широком интервале температурного режима (25°C – 50°C) не оказывало существенного влияния на сорбцию полифенолов ЭЛЧ.

При увеличении продолжительности инкубации с 30 до 60 мин сорбция полифенолов возросла от $10,4 \pm 0,4$ мг-экв. г.к./г муки до $13,1 \pm 0,3$ мг-экв. г.к./г муки (рис. 19). Дальнейшее увеличение времени инкубации приводило к недостоверному снижению сорбции.

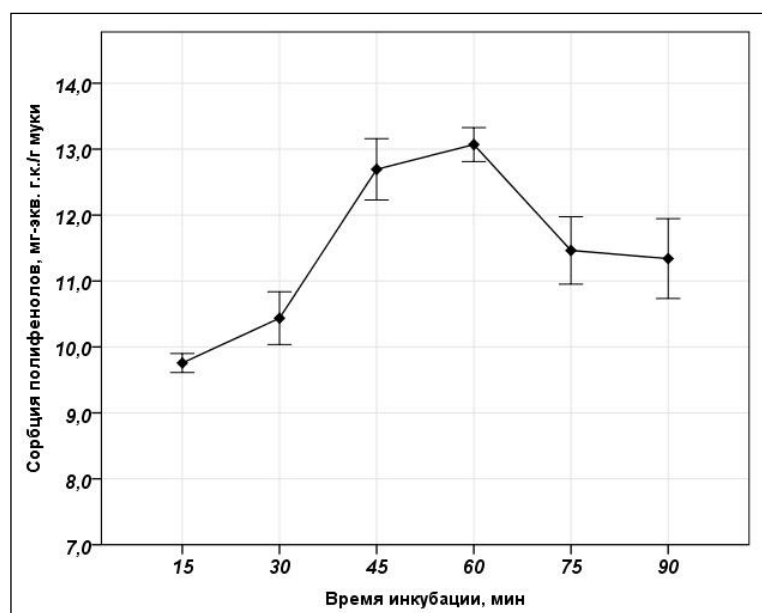


Рисунок 19 – Зависимость сорбции полифенолов экстракта листьев черники на гречневой муке от продолжительности инкубации смеси, мг-экв. галловой к-ты/г муки (0,5% р-р ЭЛЧ, рН 3,6, навеска муки 1г, инкубация при 25°C).

В ходе экспериментов были определены следующие оптимальные условия сорбции полифенолов ЭЛЧ на гречневой муке: концентрация раствора экстракта 2%, рН раствора 3,6, соотношение навески муки и объема раствора экстракта 1г/50мл, температура 25°C, время смешивания 45 мин. Экспериментальную партию пищевого ингредиента получали путем смешивания 2% раствора экстракта листьев черники (рН 3,6) с навеской гречневой муки (прошедшей измельчение на ножевой мельнице) в соотношении 1г/50мл раствора в течение 45 мин при 25°C [118].

3.3 Характеристика пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке

Максимальное содержание общих полифенолов в составе пищевого ингредиента, определяемое их элюированием с носителя, составило $23,7 \pm 0,5$ мг-экв. галловой кислоты (г.к.)/г муки.

На рисунке 20 представлена технологическая схема получения пищевого ингредиента [161].



Рисунок 20 – Технологическая схема получения пищевого ингредиента

1

В таблице 5 представлен профиль флавоноидов концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке, полученного для проведения исследований *in vivo*, в сравнении с составом экстракта листьев черники. Суммарное содержание флавоноидов в полученном пищевом ингредиенте составило $1,37 \pm 0,1$ мг/г.

Таблица 5 – Профиль флавоноидов в образцах экстракта листьев черники и пищевого ингредиента 1

Флавоноид	Содержание в образце, % от общей суммы флавоноидов	
	Экстракт листьев черники	Пищевой ингредиент 1
С-гликозиды лютеолина (ориентин+изоориентин)	4,3	4,0
С-гликозиды апигенина (витексин, изовитексин)	2,9	2,6
Мирицетин-3-галактозид	10,8	10,1
Рутин	10,8	10,1
Лютеолин-7-глюкозид	4,6	4,8
Гиперозид	10,5	10,6
Изокверцитрин	13,3	14,1
Лютеолин-7-глюкуронид	4,0	5,3
Изорамнетин-3-глюкозид	1,9	0,9
Астрагалин	1,1	1,3
Авикулярин	3,5	4,0
Апигенин-7-глюкозид	5,8	7,9
Мирицетин	2,1	1,8
Лютеолин	3,1	3,5
Кверцетин	1,7	2,6
Апигенин	0,4	0,4
Остальные флавоноиды	19,1	15,9

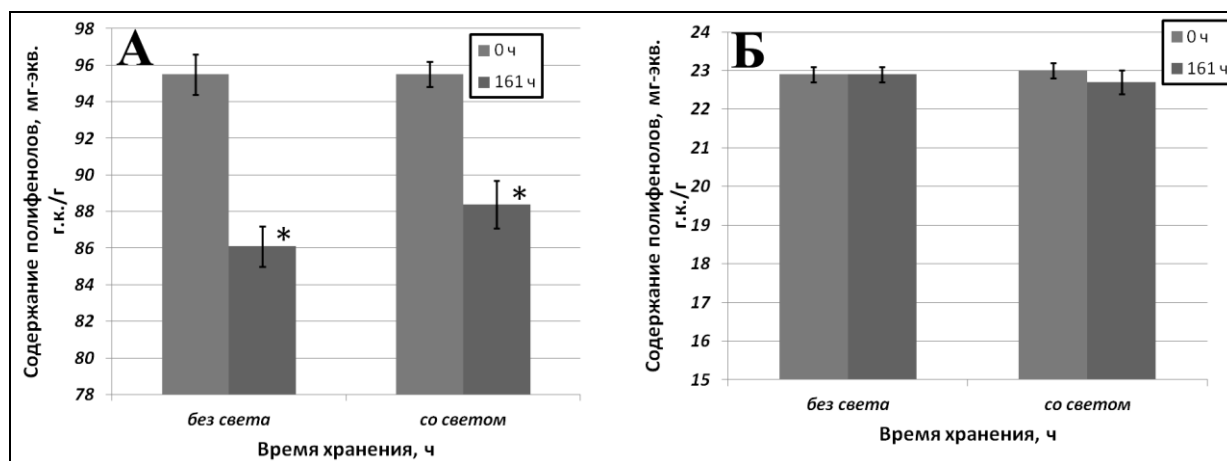
Как видно из таблицы профиль флавоноидов пищевого ингредиента был идентичен профилю экстракта листьев черники.

Содержание гидроксикоричных кислот в составе ингредиента – $2,22 \pm 0,2$ мг/г муки, проантоцианидинов – $0,45 \pm 0,04$ мг/г муки, гидролизуемых танинов – $11,1 \pm 1,1$ мг/г муки.

Оценку стабильности полифенолов в составе пищевого ингредиента проводили следующим образом. Половина образцов сухого экстракта листьев черники и образцов пищевого ингредиента была помещена в климатическую камеру (POL-EKO-APARATURA, Польша) при температуре

50°C и относительной влажности воздуха 50%. Вторая половина выдерживалась при тех же температурно-влажностных условиях с дополнительным воздействием света. Исследование проводилось в течение 7 суток. Контрольные точки для отбора проб от начала загрузки в климатическую камеру составили: 16 ч, 24 ч, 40 ч, 48 ч, 64 ч, 72 ч, 88,5 ч, 136,5 ч, 144 ч, 161 ч [131].

При хранении исходного сухого ЭЛЧ (рис. 21А) в течение 72 ч содержание полифенолов снизилось с $95,5 \pm 1,1$ мг-экв. г.к./г экстракта в исходном образце до значений $86,1 \pm 0,7$ мг-экв. г.к./г экстракта при хранении в темноте и до $88,4 \pm 1,3$ мг-экв. г.к./г экстракта при хранении на свету. При дальнейшем хранении в течение 89 ч эти значения не изменились. При хранении пищевого ингредиента - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на гречневой муке (рис. 21Б), как в темноте, так и при освещении в течение всего срока (161 ч) не наблюдалось статистически значимого снижения содержания полифенолов, выраженного в эквивалентах галловой кислоты ($22,9 \pm 0,2$ мг-экв. г.к./г муки).



Примечание – 0ч – содержание в исходных образцах; * - различия достоверны по сравнению с исходным содержанием, $p < 0,05$.

Рисунок 21 – Стабильность полифенолов в составе экстракта (А) и пищевого ингредиента 1 (Б) при хранении в течение 161 ч

Полученные результаты, также представленные в работе [118], свидетельствуют о сохранении стабильности полифенолов, сорбированных на измельченной гречневой муке, при хранении, что согласуется с результатами работы [124], в которой полифенолы в составе комплекса с соевой мукой сохраняли биологические свойства в течение 20 недель после получения.

3.4 Характеристика пищевого ингредиента 2 - концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке

Полученный пищевой ингредиент представлял собой мелкодисперсный порошок темно-фиолетового цвета. Массовая доля белка в ингредиенте составила 7,9%, массовая доля жира – 3,8%, углеводов – 87,5%, золы – 0,8%. Влажность концентрата составила 4,4% [12].

На рисунке 22 представлена технологическая схема получения пищевого ингредиента.



Рисунок 22 – Технологическая схема получения пищевого ингредиента 2.

Содержание общих полифенолов в составе пищевого ингредиента составило $65,5 \pm 0,7$ мг-экв. галловой кислоты/г муки. Среднее суммарное содержание антоцианинов в составе ингредиента составило $27,3 \pm 2,7$ мг/г муки. Среднее суммарное содержание флавоноидов в составе ингредиента составило $1,2 \pm 0,1$ мг/г.

Профиль антоцианинов в исходных ягодах, сухих ягодах, экстракте и полученном пищевом ингредиенте представлен в таблице 6. Антоцианинов в составе гречневой муки не обнаружено.

Таблица 6 – Профиль антоцианинов ягод черники, экстракта и пищевого ингредиента 2

Антоцианин	Содержание, % от суммы антоцианинов			
	Ягоды свежие, замороженные	Ягоды сухие, лиофилизированные	Экстракт из ягод черники	Пищевой ингредиент 2
Дельфинидин-3-галактозид	10,7	13,1	11,5	13,1
Дельфинидин-3-глюкозид	11,6	13,3	10,9	12,0
Цианидин-3-галактозид	14,1	13,0	10,8	13,6
Дельфинидин-3-арабинозид	4,9	7,7	8,9	7,5
Цианидин-3-глюкозид	13,8	11,8	11,0	11,4
Петунидин-3-галактозид	3,4	3,2	4,2	3,7
Цианидин-3-арабинозид	9,4	8,5	7,1	6,8
Петунидин-3-глюкозид	7,3	8,0	8,6	9,0
Пеонидин-3-галактозид	2,7	1,9	2,3	2,6
Петунидин-3-арабинозид	2,0	2,5	1,8	2,2
Мальвидин-3-галактозид	2,8	2,2	4,8	2,5
Пеонидин-3-глюкозид	7,2	5,7	5,8	6,5
Мальвидин-3-глюкозид	8,3	7,4	10,3	7,3
Мальвидин-3-арабинозид	1,8	1,7	1,9	1,8
Сумма антоцианинов	4,7±0,4 мг/г	18,9±1,9 мг/г	14,6±1,3 мг/мл	27,3±2,7 мг/г

Профиль флавоноидов в сухих ягодах, исходном экстракте, полученном ингредиенте и муке представлен в таблице 7. Наличие рутина в составе пищевого ингредиента объясняется наличием рутина в составе гречневой муки.

Таблица 7 – Профиль флавоноидов ягод черники, экстракта, гречневой муки и пищевого ингредиента 2

Флавоноид	Содержание, мг/г			
	Ягоды сухие, лиофилизированные	Экстракт из ягод черники	Пищевой ингредиент 2	Гречневая мука
Мирицетин-гексозид	0,326	0,0853	0,230	-
Гептагидроксифлавоп метиловый эфир гексозид	0,363	0,0905	0,229	-
Мирицетин-3-галактозид	0,139	0,0527	0,081	-
Мирицетин-3-глюкозид	0,120	0,0469	0,067	-
Гептагидроксифлавоп метиловый эфир пентозид	0,131	0,0323	0,090	-
Гептагидроксифлавоп метиловый эфир рамнозид	0,048	0,0200	0,027	-
Рутин		-	0,025	0,096
Ларицитрин-3-глюкозид	0,335*	0,1289*	0,201*	-
Гиперозид				0,003
Изокверцитрин	0,064	0,0255	0,038	0,003
Кверцетин-3-глюкуронид	0,307	0,1174	0,180	-
Кверцетин-пентозид	0,044	0,0155	0,026	-
Сирингетин-3-глюкозид	0,109	0,0375	0,052	-
Изорамнетин-3-глюкозид	0,015	0,0054	0,010	-
Кверцитрин	0,027	0,0086	0,016	-
Сирингетин-3-глюкуронид	0,041	0,0103	0,029	-
Изорамнетин-3-глюкуронид	0,011	0,0033	0,005	-
Мирицетин	0,116	0,0391	0,079	-
Кверцетин	0,009	0,0027	0,007	0,001
Ларицитрин	0,018	0,0061	0,017	-
Сирингетин	0,006	0,0029	0,004	-
Сумма флавоноидов (флавонолы и их гликозиды)	2,2±0,2 мг/г	0,7±0,1 мг/мл	1,2±0,1 мг/г	0,10±0,01 мг/г

Примечание - * представлено суммарное содержание

Содержание простых углеводов – глюкозы, фруктозы, сахарозы – в образцах ягод, экстракта и пищевого ингредиента представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание простых углеводов в составе ягод и пищевого ингредиента 2

Углевод	Содержание, %	
	Ягоды сухие, лиофилизированные	Пищевой ингредиент 2
Глюкоза	11,9±1,1	ниже чувствительности метода определения
Фруктоза	8,5±0,9	ниже чувствительности метода определения
Сахароза	2,2±0,2	ниже чувствительности метода определения

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии сорбции моно- и дисахаридов из ягод черники на гречневой муке. Соответственно, целенаправленное концентрирование полифенолов ягод черники на гречневой муке позволяет получить пищевой ингредиент с низким содержанием легкоусвояемых углеводов.

3.5 Характеристика пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца

В размолотом зерне черного киноа содержание 20Е составило – (0,16±0,02) мг/г зерна, содержание флавоноидов – (0,27±0,03) мг/г зерна,

Полученный пищевой ингредиент представлял собой мелкодисперсный порошок светло-коричневого цвета. Содержание 20Е в полученном ингредиенте составило 3,4±0,3 мг/г, содержание флавоноидов – 14,1±1,4 мг/г. Содержание белка в составе ингредиента составило 98%.

На рисунке 23 представлена технологическая схема получения пищевого ингредиента 3 [116].

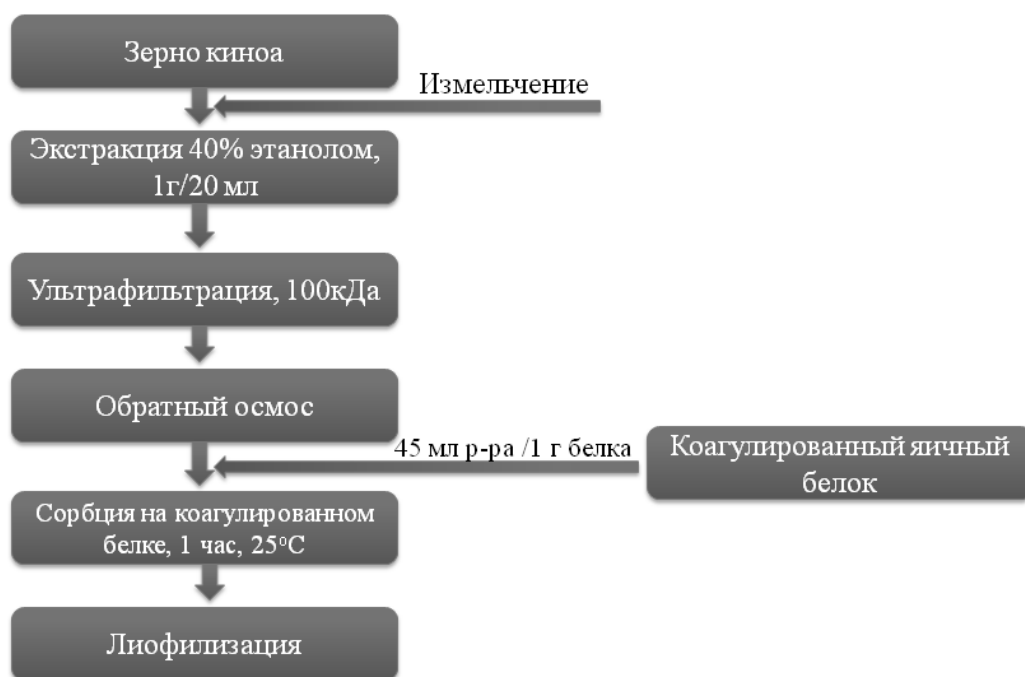


Рисунок 23 – Технологическая схема получения пищевого ингредиента 3.

Таблица 9 – Профиль флавоноидов экстракта зерна черного киноа и пищевого ингредиента 3

Флавоноид	Содержание в образце, мг/г	
	Зерно черного киноа	Пищевой ингредиент 3
Сумма флавоноидов, в т.ч.	0,27±0,03	14,1±1,4
Кверцетин-3-О-(2,6-ди-α-L-рамнопиранозил)-β-D-галактопиранозид	0,10±0,01	5,2±0,5
Кверцетин-3-О-β-D-апиофуранозил-(1→2)-О-α-L-рамнопиранозил-(1→6)-β-D-галактопиранозид	0,08±0,01	4,6±0,5
Кемпферол-3-О-(2,6-ди-α-L-рамнопиранозил)-β-D-галактопиранозид	0,05±0,01	2,4±0,2
Другие флавоноиды	0,04±0,01	1,9±0,2

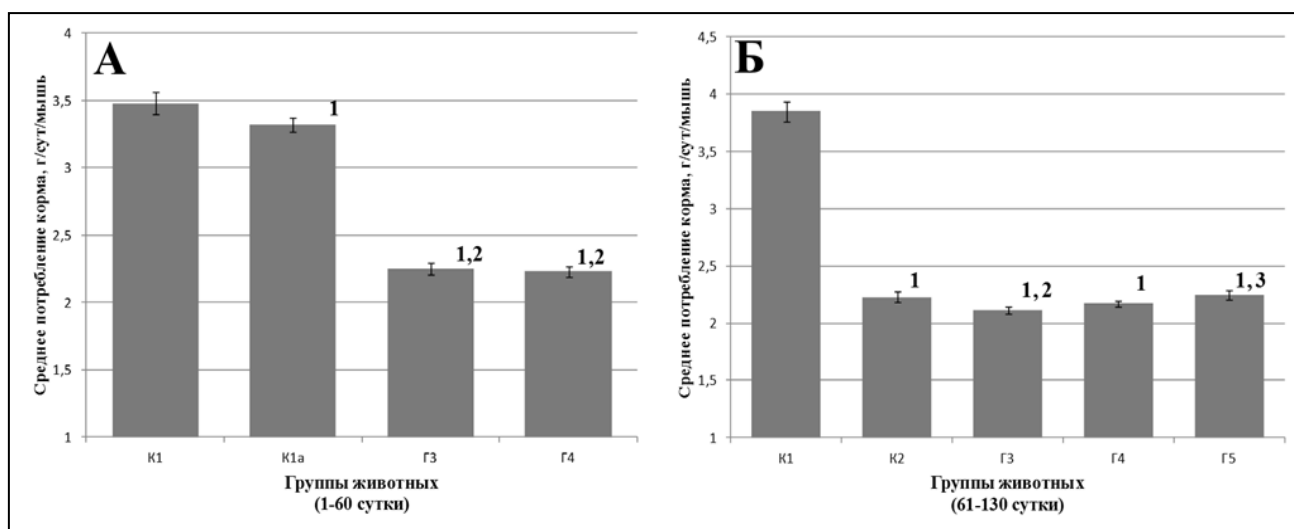
Разработанная технологическая схема получения пищевого ингредиента позволяет сконцентрировать фитоэкдистероиды более чем в 20

раз, а флавоноиды более чем в 50 раз по сравнению с исходным сырьем (табл. 9).

3.6 Сравнительная физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 1), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона

Результаты исследования представлены в [20, 117]. Общее состояние животных контрольной группы К1 по внешнему виду, качеству шерстного покрова, потреблению корма и воды, поведению и скорости роста при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным. Общее состояние животных контрольной группы К1а (К2) и опытных групп Г3, Г4, Г5 по внешнему виду и качеству шерстного покрова отличалось от такового контрольной группы К1, шерсть у животных была жирная, тонкая, редкая и взъерошенная. Животные группы Г4, получавшие пищевой ингредиент 1 в дозе 5 г на 100 г корма, отличались повышенной агрессивностью.

Потребление корма животными всех групп представлено на рисунке 24.

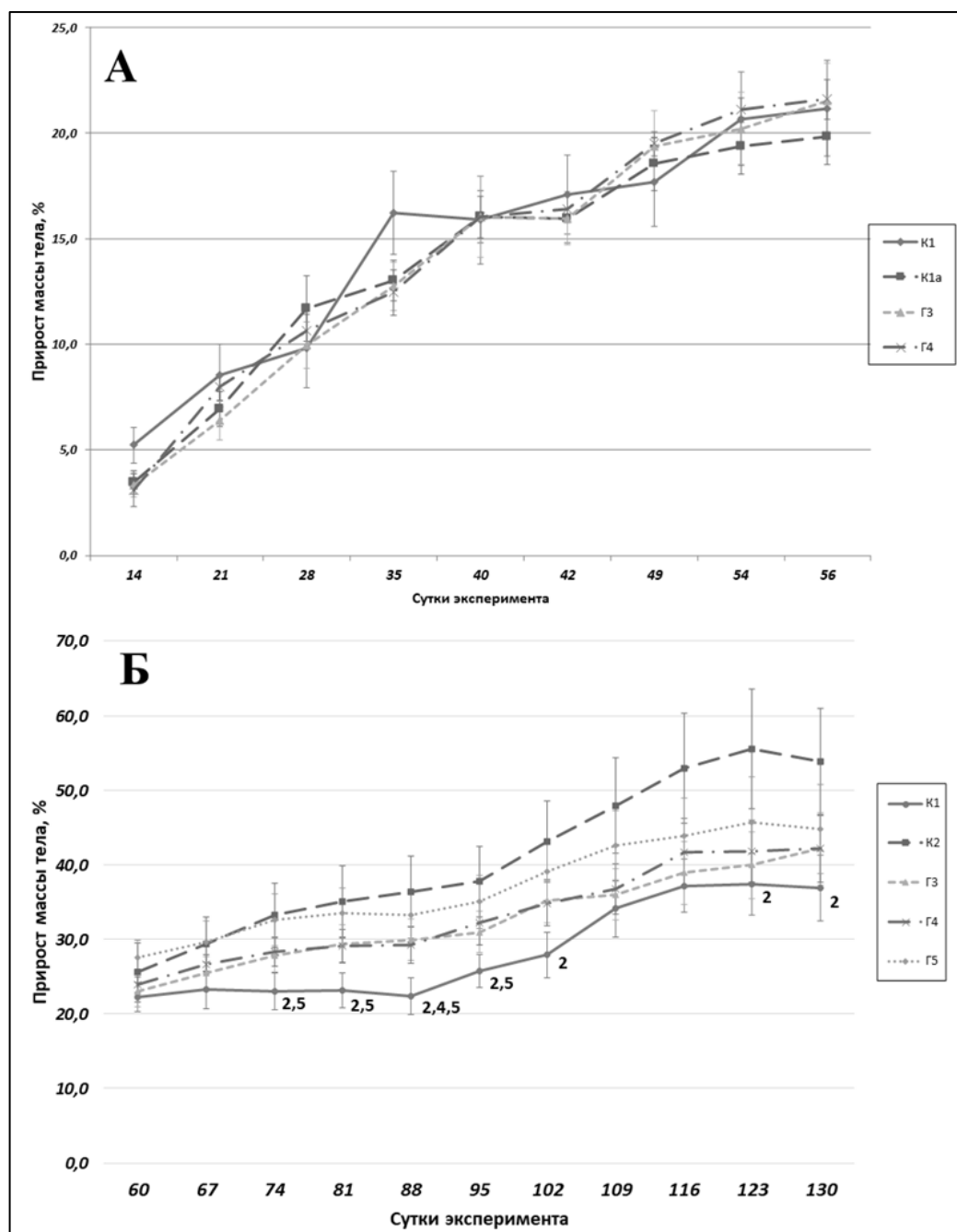


Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой K1; 2 – различия достоверны по сравнению с группами K1a/K2; 3 – различия достоверны по сравнению с группой G3; $p < 0,05$

Рисунок 24 – Среднее потребление корма животными; А – 1-60 сутки эксперимента, Б – 61-130 сутки эксперимента

Как следует из данных, представленных на рисунке 24А, на протяжении первых 60 суток эксперимента мыши всех групп, получавших ВЖВУ рацион, достоверно меньше потребляли корма по сравнению с животными контрольной группы K1, получавшими стандартный рацион, что, по-видимому, связано с большей калорийностью ВЖВУ корма. При этом животные групп G3 и G4, получавшие пищевой ингредиент 1, потребляли достоверно меньше корма и по сравнению с группой K1a. В течение последующих 70 суток (рис. 24Б) животные опытной группы G3 потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными обеих контрольных групп. Этот результат свидетельствует о снижении аппетита на фоне потребления пищевого ингредиента. Потребление полифенолов для опытных групп составило: для группы G3 – $65,8 \pm 1,1$ мг-экв. г.к./кг массы тела/сутки; G4 – $129,4 \pm 1,1$ мг-экв. г.к./кг массы тела/сутки; для группы G5 – $68,3 \pm 1,5$ мг-экв. г.к./кг массы тела/сутки.

На рисунке 25 представлена кривая прироста массы тела животных.



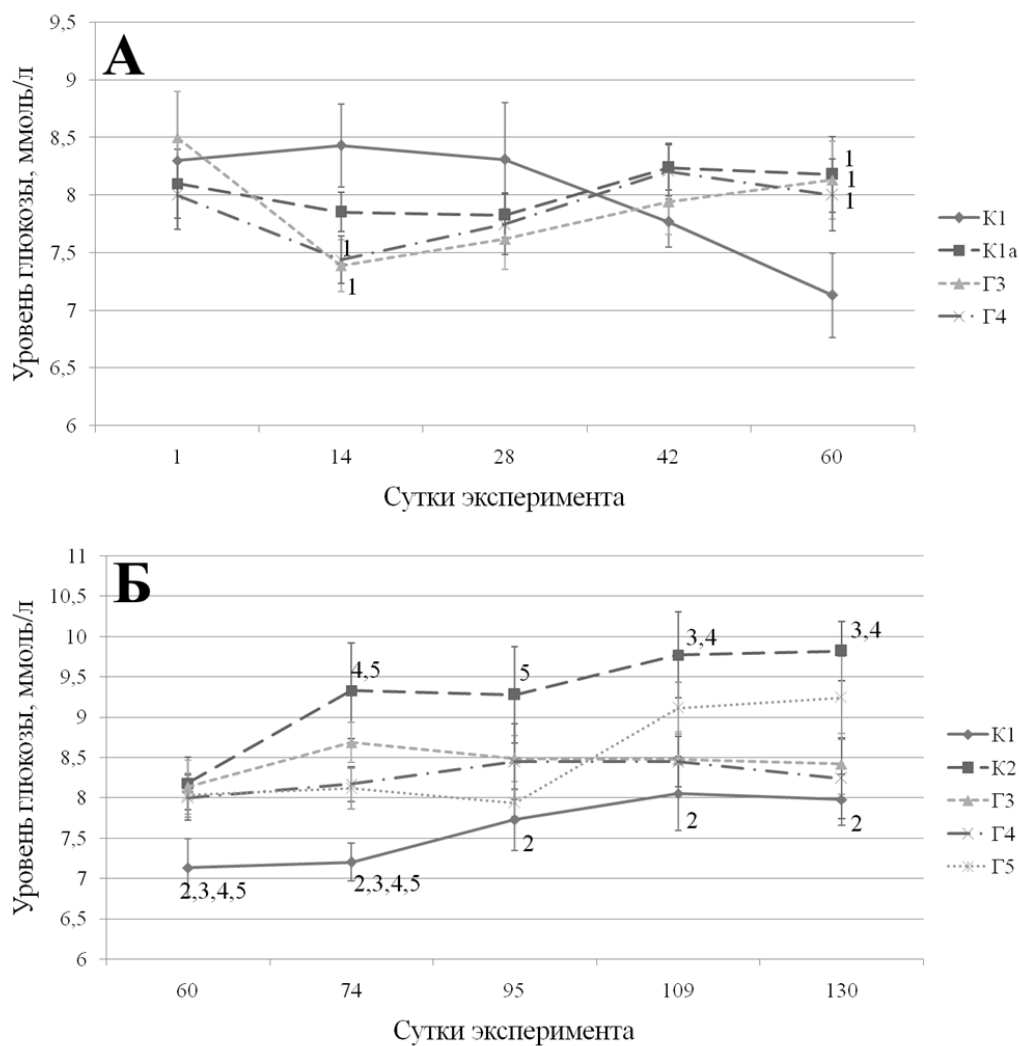
Примечание – 2 – различия достоверны по сравнению с группой К2; 4 – различия достоверны по сравнению с группой Г4; различия достоверны по сравнению с группой Г5; $p < 0,05$

Рисунок 25 – Прирост массы тела животных, %; А – 1-60 сутки эксперимента; Б – 61-130 сутки

Прирост массы тела животных группы К1 до 74-х суток статистически значимо не отличался от прироста массы тела животных всех групп, потреблявших ВЖВУ рацион. На 74-е сутки эксперимента прирост массы тела животных группы К2, получавших ВЖВУ рацион, и животных опытной

группы Г5 (животные получали кпищевой ингредиент 1 в течение только 2-х недель), стал статистически значимо выше по сравнению с группой К1 и оставался таким вплоть до 95-х суток. Полученный результат может свидетельствовать о начале развития признаков ожирения у животных этих групп, длительно получавших ВЖВУ рацион. Начиная с 102 суток эксперимента, прирост массы тела животных опытных групп Г3, Г4 и Г5, получавших пищевой ингредиент 1 в различных дозировках, вплоть до окончания эксперимента статистически значимо не отличался от показателя контрольной группы К1.

Уровень глюкозы крови. Мониторинг уровня глюкозы в крови животных проводился на всем протяжении эксперимента (рис. 26). Начиная с 60-х суток эксперимента и до конца, 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 и 74 сутки эксперимента (рис. 26Б) 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 26 – Динамика глюкозы крови, ммоль/л; А – 1-60 сутки эксперимента; Б – 61-130 сутки

При этом на 74 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 сутки эксперимента различие в уровне глюкозы в крови по сравнению с группой К2 было достоверным только для опытной группы Г5. Начиная с 109 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 [81], 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) [163].

Начиная с 95 суток эксперимента и до его окончания не выявлено достоверных различий в уровне глюкозы крови животных группы Г5, начавших получать концентрат полифенолов с гречневой мукой с 60 суток эксперимента, по сравнению с обеими контрольными группами ($p > 0,05$), что говорит о меньшей эффективности потребления концентрата при уже развитых нарушениях углеводного обмена.

Глюкозотолерантность и инсулинорезистентность. В табл. 10 представлены результаты глюкозотолерантного и инсулинорезистентного теста.

Таблица 10 – Результаты перорального глюкозотолерантного и инсулинорезистентного тестов

Показатель Группа	Глюкозотолерантность ППК ммоль/л*180мин		Инсулинорезистентность ППК ммоль/л*180мин		
	39сутки	82сутки	15сутки	45сутки	90сутки
К1	815±35	812±89	601±53	630±39	496±53
К2	933±19 ¹	1025±32 ¹	685±30	723±21 ¹	738±57 ¹
Г3	909±41	1009±54	628±59	741±41 ¹	715±57 ¹
Г4	984±47 ¹	1083±54 ¹	518±35 ²	547±53 ²	724±49 ¹
Г5	-	1119±55 ¹	-	-	777±34 ¹

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

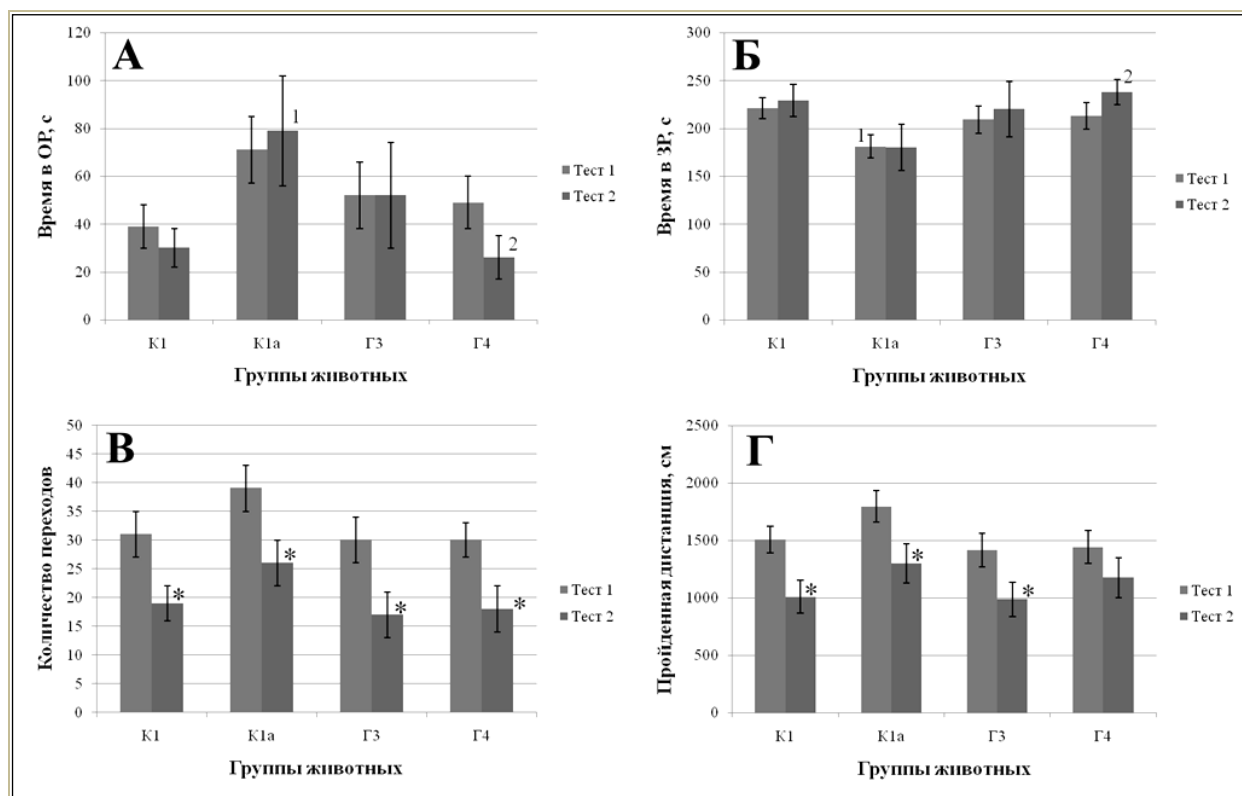
2 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К2 ($p < 0,05$)

На 39 сутки эксперимента в тесте на глюкозотолерантность у животных всех групп, получавших ВЖВУ рацион, был отмечен рост ППК, причем у животных групп К2 и Г4 увеличение было достоверным по сравнению с группой К1. На 82 сутки эксперимента показатель ППК только для животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 1 в дозе 2,5 г/100 г рациона, не отличался статистически значимо от показателя ППК для животных группы К1. Увеличение показателя ППК у животных групп, потреблявших ВЖВУ рацион, по сравнению с данным показателем животных контрольной группы К1, говорит о развитии у этих животных состояния толерантности к глюкозе.

Показатель ППК в тесте на инсулинорезистентность на 15 и 45 сутки был наименьшим у животных группы Г4, получавших пищевой ингредиент в дозе 5,0 г/100 г рациона. К 91 суткам эксперимента у мышей всех опытных групп показатель ППК достоверно возрос по сравнению с контрольной группой К1. Достоверное увеличение показателя ППК на 45 сутки у животных групп К2 и Г3 по сравнению с животными контрольной группы К1 ($p < 0,05$) свидетельствует о развитии резистентности к инсулину у этих животных. Потребление пищевого ингредиента 1 в количестве 5,0 г/100 г корма замедлило развитие этого состояния.

Результаты физиологических тестов

На рисунке 27 представлены результаты проведения теста ПКЛ.



Примечание – А – время в открытых рукавах, сек; Б – время в закрытых рукавах, сек; В – количество переходов; Г – пройденная дистанция, см; 1- различия достоверны по сравнению с группой К1 в соответствующий день теста, 2 – различия достоверны по сравнению с группой К2 в соответствующий день теста, * - различия достоверны по сравнению с первым тестированием ($p < 0,05$)

Рисунок 27 – Результаты теста Приподнятый крестообразный лабиринт

Как видно из данных, представленных на рисунке 27(В, Г), при первом тестировании, проводимом на 40 сутки кормления, не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям общей активности, а именно: общему числу переходов между рукавами лабиринта и пройденной дистанцией. Животные группы К2 больше времени проводили в ОР и меньше в ЗР по сравнению с контролем К1. При втором тестировании, проводимом на 90 сутки кормления, отмечено достоверное снижение показателей общей исследовательской активности, а именно: общего числа переходов у животных всех групп, по сравнению с первым тестированием и общей пройденной дистанции у групп К1, К2, Г3 по сравнению с первым тестированием. Достоверного отличия по показателю пройденной дистанции не выявлено только для группы Г4, получавшей пищевой ингредиент 1 в дозе

5г/100 г рациона. По показателям тревожности не выявлено отличий между группами в первом и втором тестировании. Однако животные группы К2 проводили достоверно больше времени в ОР по сравнению с контрольной группой К1 на 90 сутки эксперимента. При этом животные группы Г4 проводили достоверно меньше времени в ОР и больше в ЗР по сравнению с контрольной группой К2. Полученный результат говорит о возможном снижении тревожности животных контрольной группы К2 по сравнению с животными группы К1.

В таблице 11 представлены результаты теста УРПИ на 49, 50 и 70-е сутки эксперимента.

Таблица 11 – Результаты тестирования краткосрочной и долгосрочной памяти

Показатель/ Группы	Время пребывания, с		
	Первый тест (49 сутки, выработка УРПИ)	Второе тестирование (через 24 часа, 50 сутки) Краткосрочная память	Третье тестирование (через 3 недели, 70 сутки) Долгосрочная память
	Время входа, с	Время входа, с	Время входа, с
К1	87,3±24,6	180,0	180,0
К2	94,2±13,8	180,0	161,6±11,6
Г3	96,0±13,7	180	180,0
Г4	72,9±10,9	163,4±16,6	145,8±22,6

Во время первого тестирования (выработки УРПИ) животные всех групп входили в темный отсек камеры (100% выработка рефлекса). На вторые сутки тестирования краткосрочной памяти статистически значимых различий во времени латентного 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 значимого влияния экспериментальных рационов на обучаемость и память животных.

Биохимические показатели. На 130 сутки животных выводили из эксперимента декапитацией под легким эфирным наркозом. В таблице 12 представлены результаты определения ряда показателей углеводного и липидного обмена в крови и печени животных всех пяти групп после их выведения из эксперимента.

Таблица 12 – Биохимические показатели крови и печени животных

Показатель	Группа				
	К1	К2	Г3	Г4	Г5
Гликированный гемоглобин, %	5,4±0,2	5,7±0,2	5,4±0,1	5,5±0,1	5,4±0,1
Лептин, нг/мл	0,9±0,3	1,6±0,3	0,6±0,2 ²	0,6±0,2 ²	1,1±0,4
Грелин, нг/мл	1,8±0,2	2,2±0,3	2,1±0,1	80,5±15,9 ^{1,2,3,4}	2,8±0,6
Триглицериды, ммоль/л	2,8±0,3	2,6±0,2	2,9±0,1	2,4±0,2	2,5±0,2
Холестерин, ммоль/л	1,5±0,1	1,3±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1

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; (p<0,05)

Достоверное увеличение уровня грелина в плазме крови животных группы Г4 по сравнению с животными групп К1 и К2 указывало на предотвращение избыточного набора массы тела при потреблении пищевого ингредиента 1 - концентрата полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке [109]. У мышей групп Г3 и Г4 по сравнению с мышами группы К2 также были достоверно снижены уровни лептина, что свидетельствовало об уменьшении объемов жировой ткани у животных, получавших пищевой ингредиент [6].

В исследовании [109] подтверждается опосредованное влияние полифенолов на уровни лептина и грелина, что согласуется с результатом, полученным в нашем эксперименте. 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 [129]. 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 [83].

Соответственно, потребление пищевого ингредиента 1 приводило к нормализации липидного обмена, путем регуляции уровней гормонов грелина и лептина.

Не выявлено достоверных отличий между всеми группами в содержании в крови гликированного гемоглобина. Показатели липидного профиля в печени животных также достоверно между группами не отличались.

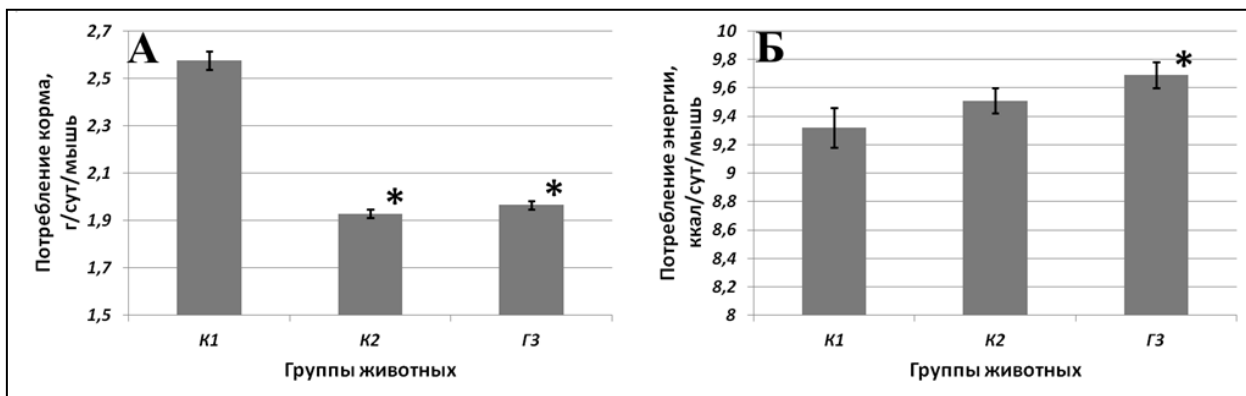
Таким образом, пищевой ингредиент 1 - концентрат полифенолов листьев черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, оказывал гипогликемическое действие, что выражалось в снижении уровня глюкозы крови и предотвращении развития состояний толерантности к глюкозе и инсулинорезистентности у молодых половозрелых мышей линии C57Bl/6, а также оказывал нормализующее влияние на липидный обмен животных путем регуляции уровней гормонов лептина и грелина.

3.7 Изучение и физиолого-биохимическая оценка эффектов концентрата полифенолов ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (пищевой ингредиент 2), при нарушениях углеводного и липидного обмена мышей линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона

Результаты исследования представлены в [16, 117]. Общее состояние животных всех групп по внешнему виду и качеству шерстного покрова при

ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

На рис. 28 представлено среднее суточное потребление корма и энергии животными на протяжении всего эксперимента.



Примечание – * – различия достоверны по сравнению с группой К1 ($p < 0,05$).

Рисунок 28 – Среднее потребление корма (г/сут/мышь, А) и энергии (ккал/сут/мышь, Б).

На протяжении эксперимента животные групп, получавших ВЖВУ-рацион, потребляли достоверно меньше корма по сравнению с животными контрольной группы К1, получавшей стандартный полусинтетический рацион. Такое различие в потреблении связано с большей калорийностью ВЖВУ рациона. При этом, потребление энергии животными группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2, было достоверно выше по сравнению с контрольной группой К1. Достоверных различий в потреблении корма и энергии между группами К2 и Г3 выявлено не было. Фактическое потребление полифенолов и антоцианинов в сутки в составе корма для опытной группы животных Г3 составило $49,4 \pm 0,3$ мг-экв. галловой к-ты/ кг массы тела и 15,8 мг/кг массы тела, соответственно. Потребление полифенолов может способствовать усилению аппетита у животных. Как показано в работе [84], потребление мышами линии C57BL/6J высокожирового рациона с добавлением экстракта красной водоросли *Gelidium amansii* (17,4 мг полифенолов/г экстракта) в количестве 250 мг/кг массы тела способствовало большему потреблению корма, по сравнению с

животными контрольной группы, потреблявшими только высокожировой рацион.

Прирост массы тела всех групп достоверно не различался на протяжении всего эксперимента (рис. 29).

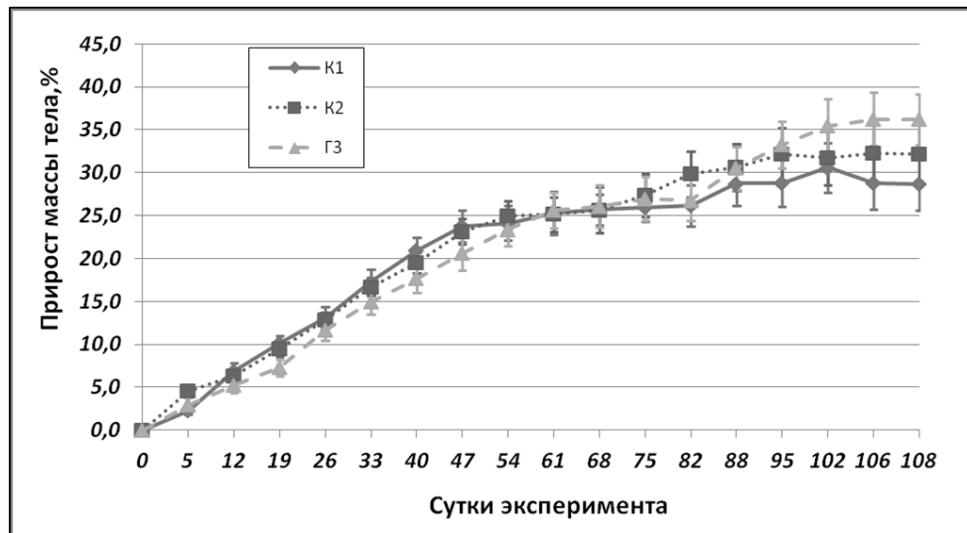
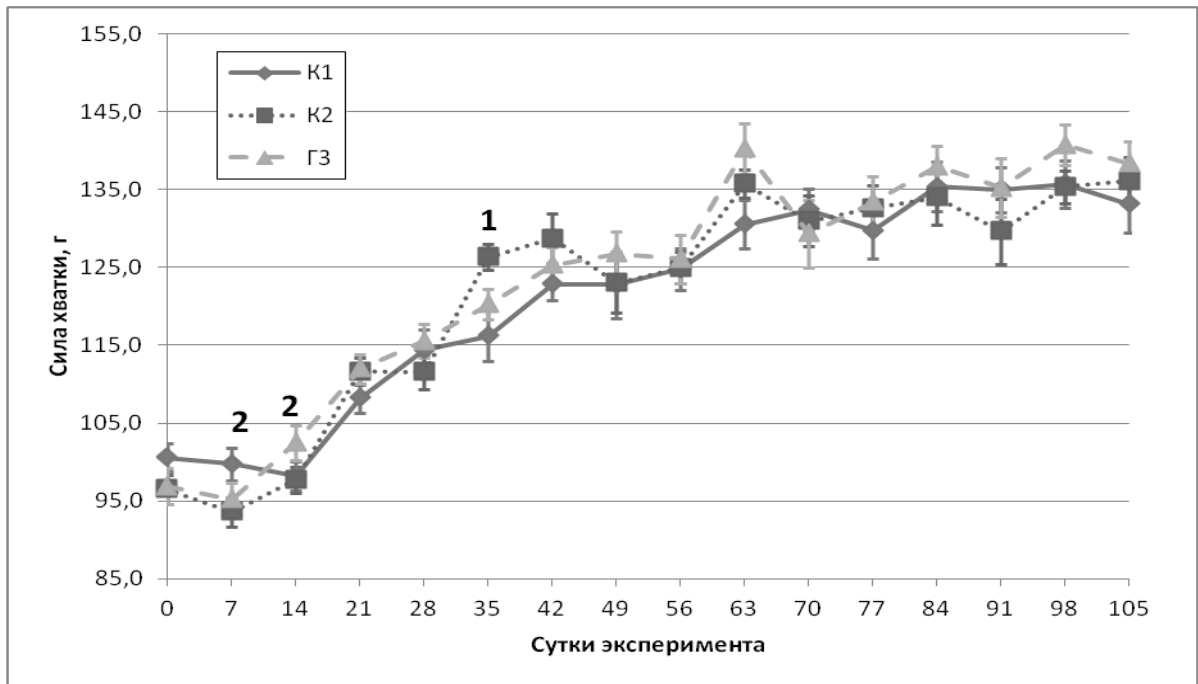


Рисунок 29 – Прирост массы тела животных, %.

Одним из осложнений таких алиментарно зависимых заболеваний, как диабет и метаболический синдром, является мышечная атрофия [55]. Развитие этого состояния обусловлено негативным воздействием активных форм кислорода на метаболизм мышечных белков [25, 76]. В работе [111] потребление мышами линии ICR с мышечной атрофией, индуцированной дексаметазоном, водного экстракта лотоса, богатого полифенолами, способствовало увеличению силы хватки этих животных относительно группы, не получавшей экстракт. В клиническом исследовании [70] у добровольцев, получавших с рационом полифенолсодержащий экстракт вишни, была лучше сила хватки, по сравнению с добровольцами контрольной группы.

На рисунке 30 представлены результаты измерения силы хватки передних лап животных на протяжении эксперимента.



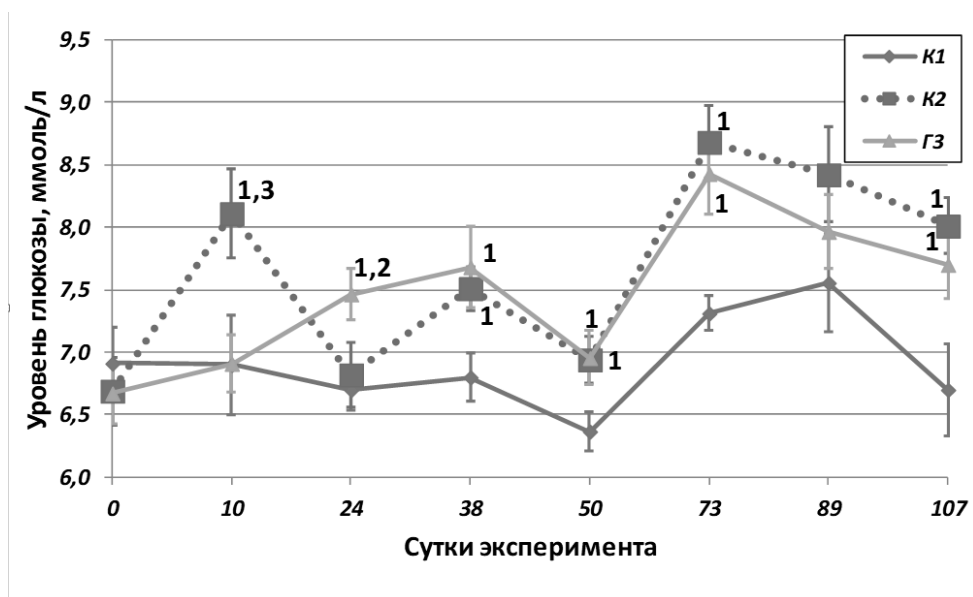
Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1 ($p < 0,05$);

2 – различия достоверны по сравнению с группой К2 ($p < 0,05$).

Рисунок 30 – Динамика силы хватки животных, г.

На 7 сутки эксперимента сила хватки животных группы К1 была достоверно выше по сравнению с показателем животных группы К2. На 14 сутки сила хватки животных группы Г3 была достоверно выше относительно животных группы К2. На 35 сутки эксперимента показатель группы К2 был достоверно выше показателя животных группы К1. Начиная с 42 суток и до конца эксперимента достоверных различий в силе хватки между животными всех групп выявлено не было.

На рисунке 31 представлены данные мониторинга уровня глюкозы на протяжении эксперимента.

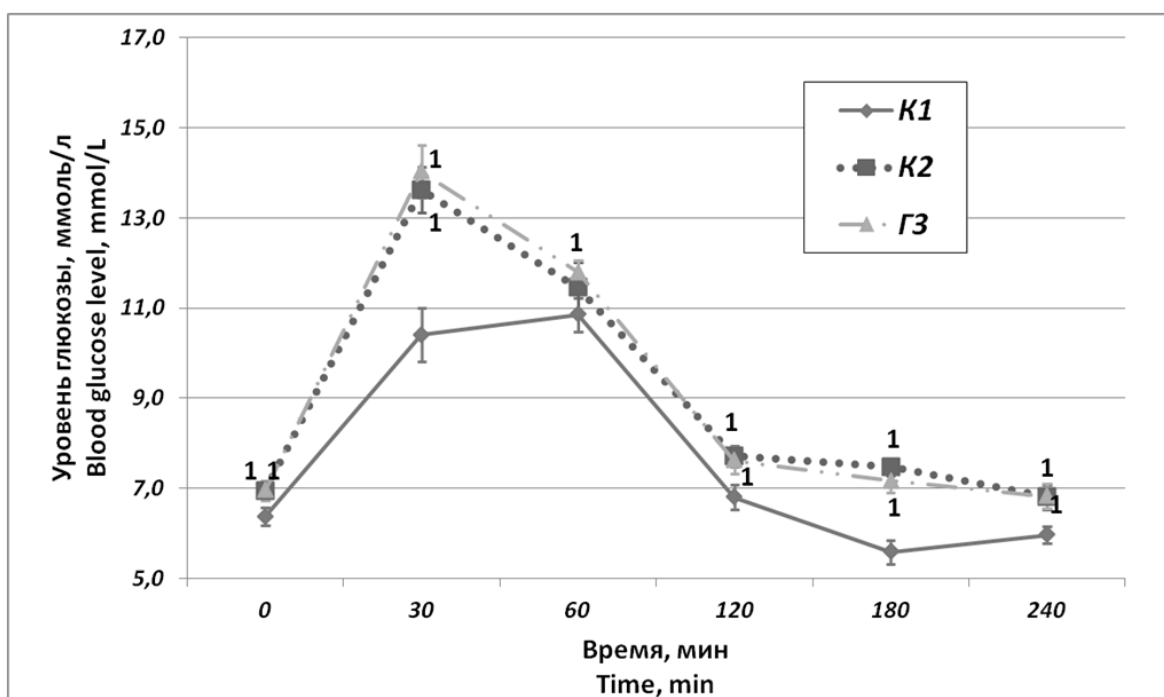


Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1 ($p < 0,05$);
 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ($p < 0,05$).

Рисунок 31 – Динамика уровня глюкозы животных, ммоль/л

На 10 сутки эксперимента уровень глюкозы животных группы К2 был достоверно выше по сравнению с показателем животных групп К1 и Г3. Начиная с 24 суток у животных группы Г3 и с 38 суток у животных группы Г2 выявлено достоверное увеличение уровня глюкозы крови по сравнению с животными группы К1, которое оставалось достоверным до конца эксперимента. Выявленный результат свидетельствует о том, что потребление мышами линии С57В1/6 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.

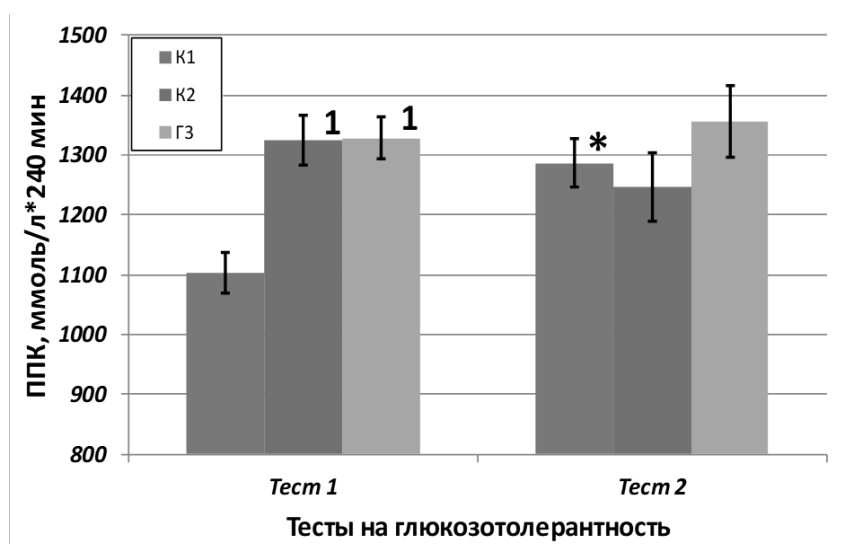
Результаты перорального глюкозотолерантного теста представлены на рисунке 32.



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

Рисунок 32 – Результаты перорального глюкозотолерантного теста на 50 сутки эксперимента

По результатам первого тестирования на 50 сутки эксперимента подтверждено развитие нарушений углеводного обмена у мышей линии C57Bl/6 на фоне ВЖВУ рациона. Уже к 30 минуте теста уровень глюкозы крови животных обеих групп, получавших ВЖВУ рацион, поднялся до достоверно более высокого уровня по сравнению с контрольной группой K1, выше 13 ммоль/л, что говорит о развитии толерантности к глюкозе. Далее представлены результаты определения показателя ППК в глюкозотолерантном тесте на 50 (1 тест) и на 89 сутки эксперимента (2 тест).

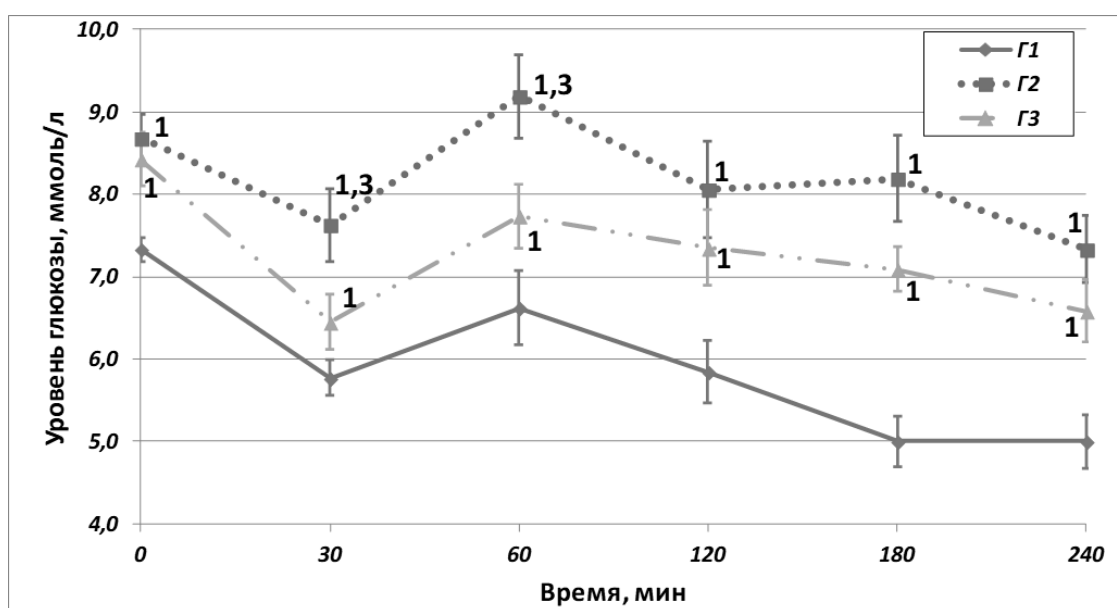


Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ($p < 0,05$); * различия достоверны по сравнению с тестом 1

Рисунок 33 – Пероральный глюкозотолерантный тест. Площадь под кривой, ммоль/л*240 мин

На 89 сутки эксперимента показан достоверный рост показателя ППК для контрольной группы К1 по сравнению с первым тестированием, что привело к нивелированию разницы между сравниваемыми группами.

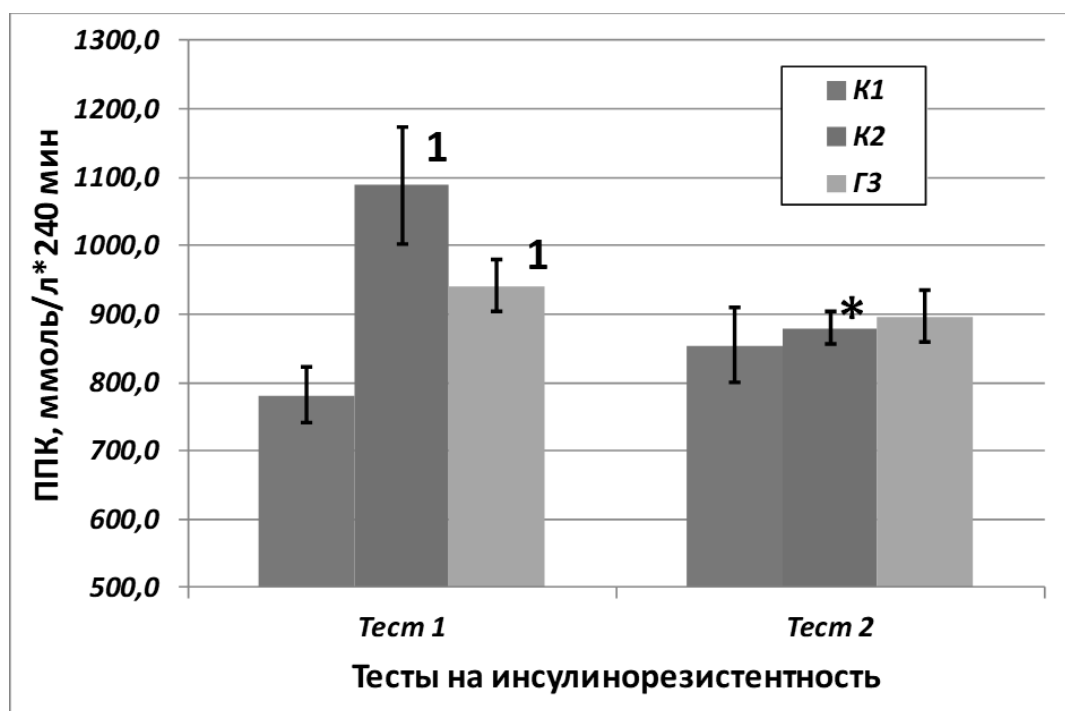
На рисунке 34 представлены результаты проведения теста на инсулинорезистентность.



Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ($p < 0,05$); 3 – различия достоверны по сравнению с группой Г3 ($p < 0,05$).

Рисунок 34 – Результаты инсулинорезистентного теста на 73 сутки

На рисунке 34 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 минуты теста. Это говорит о развитии инсулинорезистентности, т.е. о снижении чувствительности тканей к действию экзогенного инсулина, состоянию характерному для лиц с избыточной массой тела, склонностью к артериальной гипертензии, недостаточной физической активностью и нерациональным питанием. Можно отметить, что на 30 и 60 минуте теста уровень глюкозы у животных опытной группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2, был достоверно ниже показателя для животных группы К2. Далее представлены результаты определения показателя ППК в инсулинорезистентном тесте на 73 (1 тест) и на 107 сутки эксперимента (2 тест).



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

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

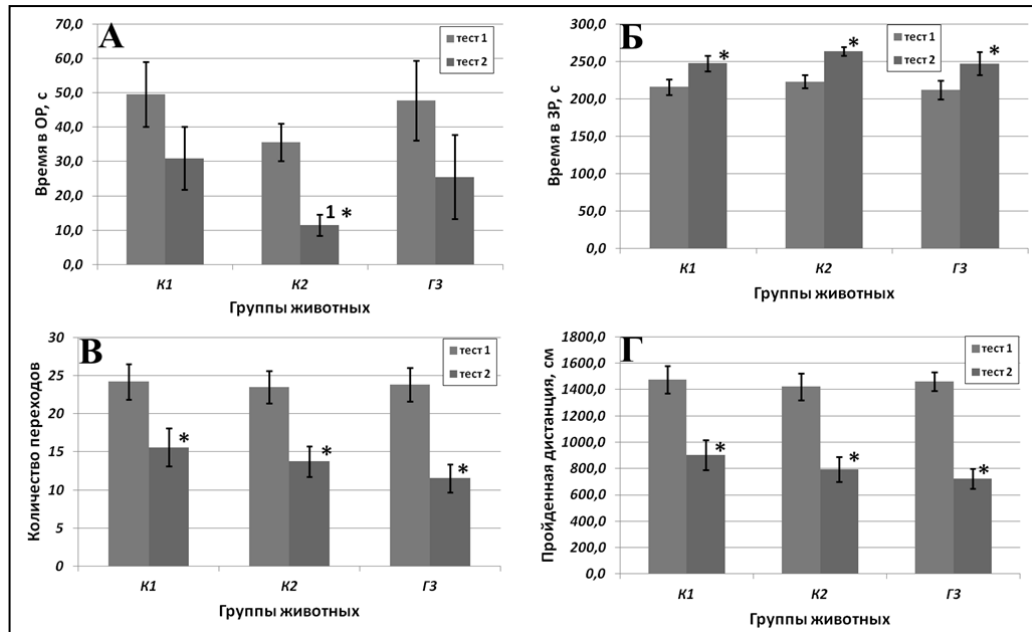
Рисунок 35 – Инсулинорезистентный тест. Площадь под кривой, ммоль/л*240 мин

Показатель ППК на 73 сутки эксперимента для групп К2 и Г3, получавших ВЖВУ рацион, также был достоверно выше по сравнению с показателем для животных контрольной группы К1. Заметна четкая тенденция, как и в случае с результатами, представленными на графике (рис. 34), снижения показателя ИРТ для животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2.

Во время второго тестирования на 107 сутки эксперимента не смотря на более высокий базовый уровень глюкозы крови животных групп К2 и Г3 показатель ППК достоверно не отличался между всеми группами (рис. 35).

Полученные в тестах ПГТТ и ИРТ результаты говорят о выраженном отрицательном влиянии потребления ВЖВУ рациона на толерантность к глюкозе и инсулинорезистентность организма мышей линии С57В1/6. Влияние пищевого ингредиента 2 показано в тесте на инсулинорезистентность, что может говорить о некотором сглаживании ответной реакции организма мышей на введение ВЖВУ рациона. На 73 сутки показатели, получаемые в тесте ПГТТ, и на 107 сутки в тесте ИРТ, сравнивались для всех групп животных.

На рисунке 36 представлены результаты теста приподнятый крестообразный лабиринт.



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

* – различия достоверны по сравнению с тестом 1 ($p < 0,05$).

Рисунок 36 – Результаты теста приподнятый крестообразный лабиринт

При первом тестировании, проводимом на 60 сутки кормления, не было отмечено достоверных отличий между животными всех групп по показателям тревожности и общей активности.

При вторичном тестировании на 101 сутки кормления поведение животных изменилось. Животные группы К2 проводили достоверно меньше времени в открытых рукавах лабиринта (рис. 36А) и достоверно больше времени в закрытых рукавах лабиринта (рис. 36Б) по сравнению с первым тестированием. Стоит отметить, что мыши этой группы проводили достоверно меньше времени в открытых рукавах лабиринта также по сравнению с контрольной группой К1. Это свидетельствует о повышенной тревожности животных контрольной группы К2, получавших ВЖВУ рацион, по сравнению с другими группами сравнения. 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. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в [19].

Животные контрольной группы К1 и опытной группы Г3 проводили достоверно больше времени в закрытых рукавах по сравнению с первым тестированием. 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 (рис. 36 В,Г).

Результаты тестирования животных на установке УРПИ представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты теста условный рефлекс пассивного избегания

Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа) Краткосрочная память		Третье тестирование (2 недели) Долгосрочная память	
	Время входа, с	Выработка УРПИ	Время входа, с	Процент вошедших животных	Время входа, с	Процент вошедших животных
К1	43±7	100%	156±10	26	125±14	41
Г2	51±9	90%	149±11	42	107±14	54
Г3	49±8	100%	137±12	40	129±13	56

Во время первого тестирования (выработки 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. В таблице 14 представлены результаты определения ряда показателей углеводного и липидного обмена в крови и печени животных всех групп после их выведения из эксперимента.

Таблица 14 – Биохимические показатели крови и печени животных

Показатель	Группы животных		
	К1	К2	Г3
Гликированный гемоглобин крови, %	5,7±0,2	5,5±0,2	5,8±0,2
Инсулин плазмы крови, нг/мл	1,3±0,2	1,6±0,2	1,1±0,2 ²
Лептин плазмы крови, пг/мл	4,3±1,2	6,9±1,9 ¹	5,8±1,6
Относительная масса печени, %	4,1±0,1	3,8±0,1 ¹	3,7±0,1 ¹
Содержание жира в печени, % (сухая / исходная масса)	17,0±1,0 / 5,9±0,4	17,3±1,8 / 6,1±0,7	20,2±1,8 / 7,0±0,7
Холестерин, мг/г печени	6,5±0,7	5,4±0,5	6,2±0,5
Триглицериды, мг/г печени	35,8±7,6	53,0±14,5	59,7±9,8

Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1 ($p < 0,05$);
2 – различия достоверны по сравнению с группой К2 ($p < 0,05$).

Уровень гликированного гемоглобина в крови достоверно не различался между животными всех групп. Уровень инсулина плазмы крови животных опытной группы Г3 был достоверно ниже по сравнению с показателем животных группы К2 и не отличался достоверно от показателя животных контрольной группы К1. Инсулин – гормон пептидной природы, синтезируемый бета-клетками островков Лангерганса, его функция состоит в регуляции обмена углеводов путем стимуляции расщепления глюкозы для последующего усвоения и превращения в энергию. 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 [162]. Лептин, в свою очередь, пептидный гормон, секретируемый адипоцитами белой жировой ткани, вызывает подавление аппетита. В норме повышение концентрации лептина происходит после обильной еды и сопровождается снижением 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 [114]. Уровень лептина в плазме крови животных группы К2 был достоверно выше по сравнению с показателем контрольной группы К1, что подтверждает развитие нарушений углеводного обмена у животных получавших ВЖВУ рацион. Уровень лептина в плазме крови животных опытной группы Г3, получавших пищевой ингредиент 2, достоверно не отличался от соответствующих показателей групп К1 и К2.

Полученный нами результат согласуется с данными представленными в работе [91], 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 схожей работе тех же авторов [99] ксантогумол снижал уровни как лептина, так и инсулина в крови мышей линии C57Bl/6J, получавших высокожировой рацион, по сравнению с тучным контролем. В работе [156] у крыс линии Sprague Dawley, получавших полифенолы зеленого чая на фоне высокожировой диеты, также показано снижение инсулина крови.

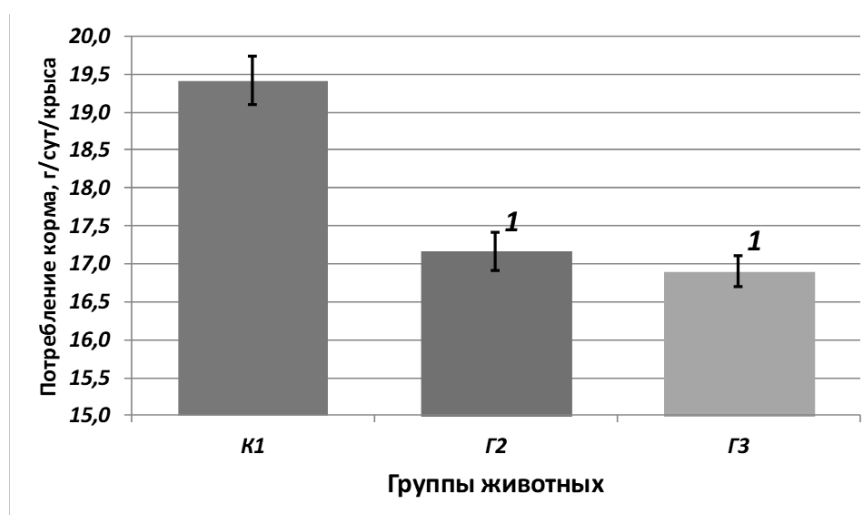
По показателям липидного обмена печени – общему содержанию жира, содержанию холестерина и триглицеридов не выявлено достоверных различий между животными всех групп.

Таким образом, потребление пищевого ингредиента 2 сглаживало ответную реакцию организма на введение экзогенного инсулина на фоне потребления ВЖВУ рациона в инсулинорезистентном тесте. Полифенольные соединения в составе 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.

3.8 Проведение сравнительной физиолого-биохимической оценки эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона 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 в условиях принудительной иммобилизации

Результаты исследования представлены в [18, 116]. Общее состояние всех животных по внешнему виду, качеству шерстного покрова, потреблению корма, воды и поведению при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

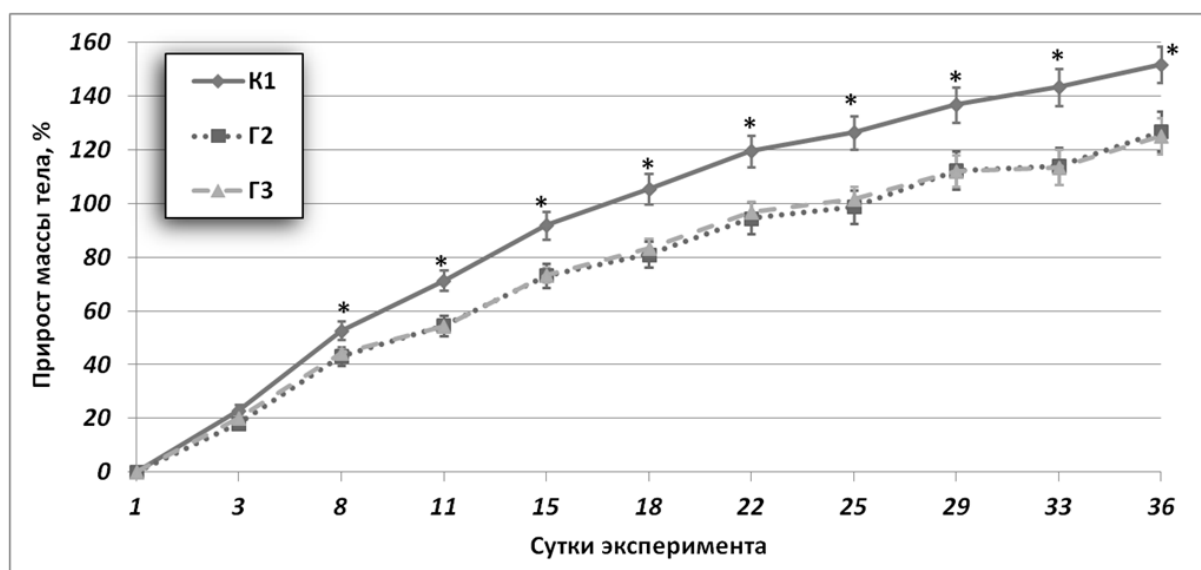
Среднее кумулятивное потребление корма стрессированными животными групп Г2 ($17,2 \pm 0,3$ г/сут/крыса) и Г3 ($16,9 \pm 0,2$ г/сут/крыса) было достоверно ($p < 0,05$) ниже по сравнению с потреблением корма контрольными (интактными) животными группы К1 ($19,4 \pm 0,3$ г/сут/крыса). Расчетное потребление 20Е в составе концентрата 20Е и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (далее пищевой ингредиент 3) животными опытной группы Г3 составило – $1,53 \pm 0,02$ мг/кг массы тела/сутки; расчетное потребление флавоноидов – $6,20 \pm 0,10$ мг/кг массы тела/сутки.



Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой K1.

Рисунок 37 – Потребление корма животными, г/сут/крыса.

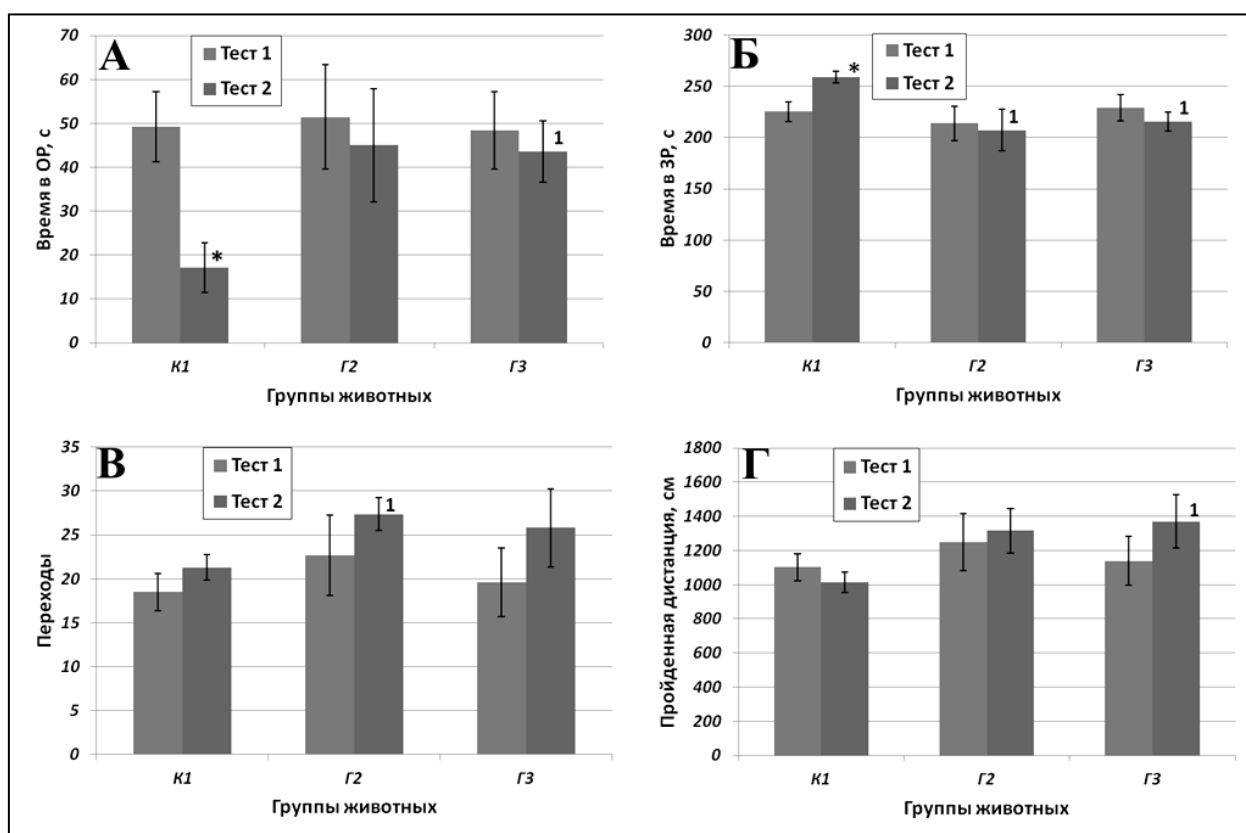
Масса тела животных групп Г2 и Г3, подверженных хроническому иммобилизационному стрессу, начиная с 8 суток эксперимента и до его окончания, была достоверно ($p < 0,01$) ниже массы тела животных группы K1. Иммобилизация является сильным стрессорным воздействием для крыс-самцов линии Вистар и приводит к достоверному отставанию в росте массы тела [18].



Примечание – * – различия достоверны по сравнению с группами G2 и G3 ($p < 0,01$).

Рисунок 38 – Динамика массы тела животных, г.

При первом тестировании на установке ПКЛ (0 сутки, рис. 39), 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.



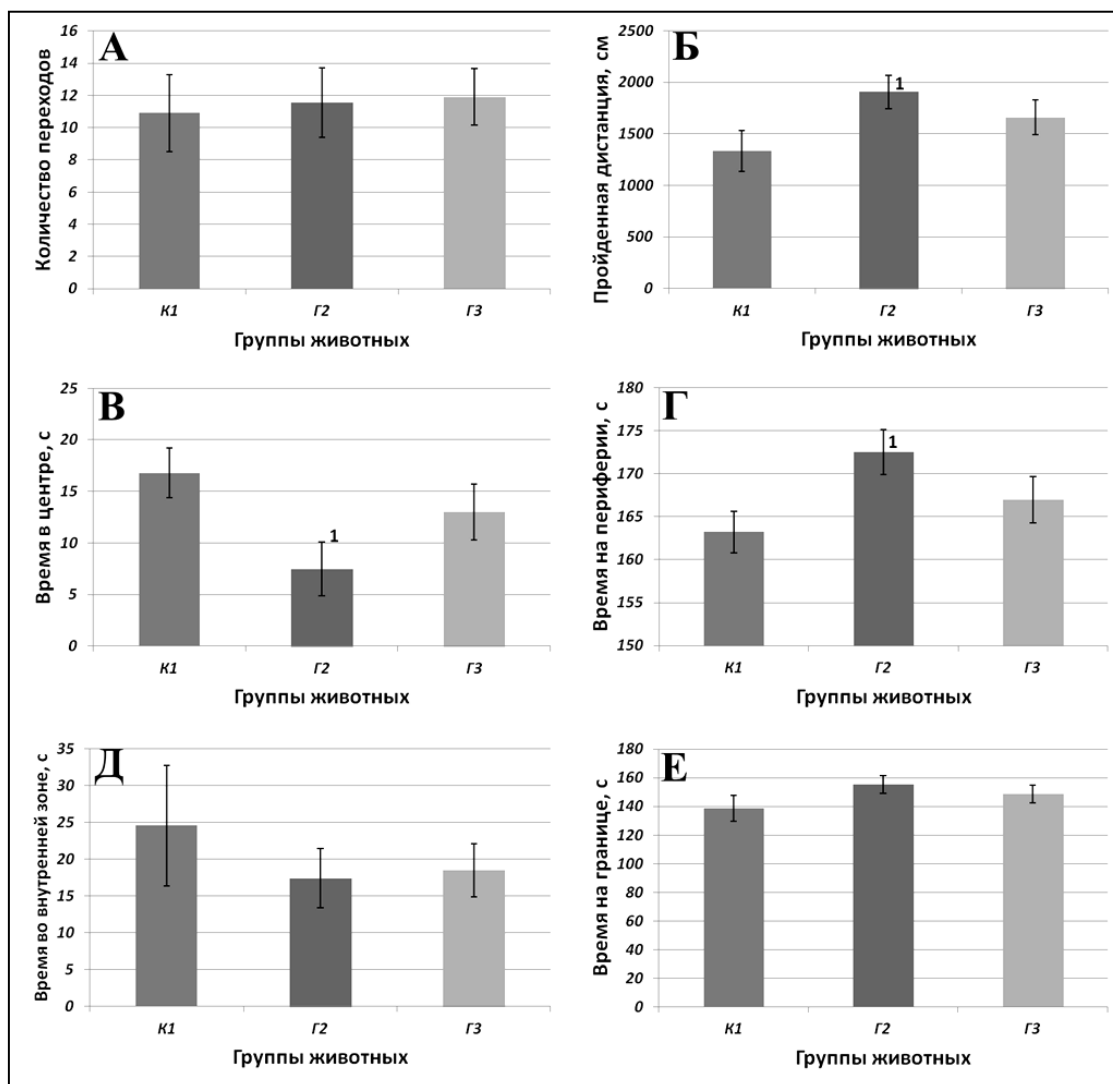
Примечание – * – различия достоверны по сравнению с первым тестированием; 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1 ($p < 0,05$).

Рисунок 39 – Результаты теста ПКЛ, А – время в открытых рукавах, с; Б – время в закрытых рукавах, с; В – количество переходов; Г – пройденная дистанция, см.

При вторичном тестировании на 28 сутки кормления (рис. 39) поведение животных изменилось. Животные группы К1 достоверно меньше времени проводили в ОР лабиринта и достоверно больше в ЗР лабиринта по

сравнению с первым тестированием ($p < 0,05$), что согласуется с возрастными изменениями в поведении животных. При этом животные групп Г2 и Г3 проводили достоверно меньше времени в ЗР лабиринта по сравнению с животными группы К1 ($p < 0,05$). Животные группы Г3 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 групп Г2 и Г3 по сравнению с животными группы К1 ($p < 0,05$).

На рисунке 40 (А.Б.В.Г.Е) представлены результаты теста Открытое поле после 22 суток кормления животных экспериментальными рационами.



Примечания – 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1.

Рисунок 40 – Результаты теста открытое поле

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 и соответственно больше времени в зоне периферии по сравнению с контрольной группой К1 ($p < 0,05$), что свидетельствует о повышенной тревожности подвергавшихся иммобилизации животных. При этом животные этой группы достоверно больше перемещались по лабиринту (рис.40Б) по сравнению с животными группы К1 ($p < 0,05$), что согласуется с данными полученными в тесте ПКЛ. Достоверных различий по показателям тревожности и исследовательской активности между животными группы Г2 и группы Г3, получавшими пищевой ингредиент 3, выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют, что потребление животными группы Г3 пищевого ингредиента 3 нивелировало негативное влияние иммобилизационного стресса на тревожность животных.

Таблица 15 – Результаты тестирования краткосрочной и долгосрочной памяти

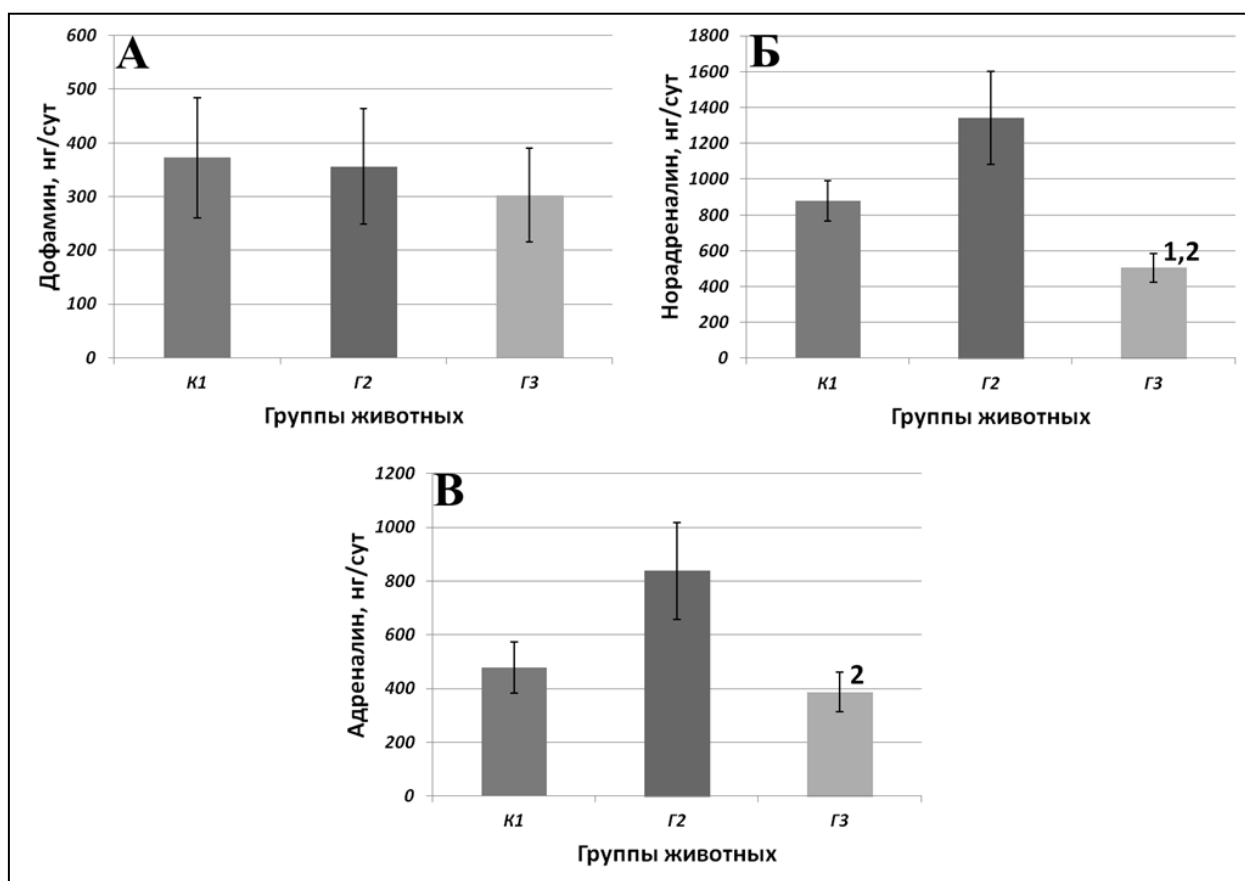
Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа) Краткосрочная память		Третье тестирование (2 недели) Долгосрочная память	
	Время входа, с	Не вошедшие животные	Время входа, с	Число вошедших животных	Время входа, с	Число вошедших животных
К1	17,6±2,6	0	116,9±22,6	5(42%)	43,0±15,4	11(92%)
Г2	26,9±8,5	0	156,3±16,4	2(17%)	74,9±22,6	8(67%)
Г3	22,7±3,1	0	155,5±16,6	2(17%)	77,9±22,0	8(67%)

Примечание – вошедшие животные – это животные, которые зашли в темный отсек установки (раздел 2.6).

Во время первого тестирования - выработки УРПИ все животные заходили в темный отсек установки (100% выработка рефлекса, табл. 15). На

2е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий во времени латентного входа в темный отсек между группами не выявлено. На 14е 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 41 представлены результаты определения суточной экскреции катехоламинов с мочой **после истощающей 3-х часовой иммобилизации животных.**



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

Рисунок 41 – 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 пищевой ингредиент 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 Е2 с мочой у животных всех групп (К1 – $20,1 \pm 2,0$ нг/сут; Г2 – $19,3 \pm 3,3$ нг/сут; Г3 – $16,9 \pm 2,1$ 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 [102, 143]. 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 - концентрата 20Е и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, направленном на сглаживание ответной реакции организма на сильный стресс.

Таблица 16 – Биохимические показатели крови животных

Показатель	Группы животных		
	К1	Г2	Г3
Общий белок, г/л	65,7±0,9	65,0±0,5	63,7±1,3
Мочевина, ммоль/л	5,25±0,11	5,06±0,07	5,22±0,12
Креатинин, мкмоль/л	25,0±0,7	26,4±1,0	25,2±0,7
Холестерин, ммоль/л	2,03±0,10	2,17±0,08	2,05±0,08
ЛПВП, ммоль/л	0,83±0,05	0,96±0,05	0,97±0,04¹
ЛПНП, ммоль/л	0,23±0,02	0,23±0,01	0,18±0,01^{1,2}
Триглицериды, ммоль/л	1,09±0,12	0,90±0,05	0,74±0,03^{1,2}
Мочевая кислота, ммоль/л	86,3±6,1	98,3±4,4	90,9±6,7
Фосфор, ммоль/л	2,90±0,05	2,96±0,06	2,87±0,08
Магний, ммоль/л	0,96±0,03	1,01±0,04	0,93±0,03
Кальций, ммоль/л	2,64±0,02	2,61±0,02	2,62±0,02
Билирубин общий, мкмоль/л	4,73±0,31	6,07±0,50¹	5,79±0,61
АЛТ, Ед./л	76,1±4,3	86,2±3,7	92,9±6,5¹
АСТ, Ед./л	178,4±19,3	136,2±23,0	255,6±18,6^{1,2}
АСТ/АЛТ	2,5±0,3	1,6±0,3^{1,3}	2,9±0,2
Щелочная фосфатаза, Ед./л	341,7±25,3	348,8±20,6	331,0±23,0
Глюкоза, ммоль/л	5,29±0,45	5,06±0,20	6,30±0,26²

Примечание – 1 – различия достоверны с группой К1; 2 – различия достоверны с группой Г2.

Анализ результатов биохимических показателей крови (таблица 16) свидетельствует, что хроническая иммобилизация вызывала только достоверное увеличение уровня общего билирубина в крови животных группы Г2 относительно животных группы К1.

При этом в крови животных группы Г3 показан достоверный рост содержания ЛПВП и падение уровня ЛПНП и триглицеридов в отличие от животных группы К1, что указывает на гиполипидемический эффект потребления пищевого ингредиента 3.

В крови животных группы Г3 показано достоверное повышение уровня АСТ по сравнению с животными групп К1 и Г2, а также повышение АЛТ относительно животных группы К1. При этом соотношение АСТ/АЛТ у животных группы Г2 достоверно ниже по сравнению с данным показателем у животных контрольной группы К1 и животных группы Г3, получавших пищевой ингредиент.

АСТ и АЛТ находятся во взаимосвязанных соотношениях. При этом АЛТ в большей мере отображает уровень анаболизма, АСТ, наоборот, -

интенсивность катаболизма. Для суждения о соотношении ката- и анаболизма вычисляют коэффициент де Ритиса – АСТ/АЛТ. При этом в здоровом организме катаболизм преобладает над анаболизмом [13].

Известно, что под влиянием адаптогенов активируются адаптивные реакции со стороны гомеостатических систем, что, соответственно, повышает общую резистентность организма, т.е. адаптоген, сам по себе, выступает в роли прострессора. Потребление пищевого ингредиента 3 животными группы Г3 приводило к увеличению уровней АЛТ и АСТ, нивелируя таким образом отрицательное влияние принудительной иммобилизации на баланс катаболических и анаболических процессов в организме крыс, что выражается в отсутствии достоверных различий коэффициента де Ритиса между контрольной группой К1 и опытной группой Г3 при достоверном его падении для крыс группы Г2.

3.9 Оценка *in vivo* биологических эффектов концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца (пищевой ингредиент 3) на уровни маркеров стресса и показатели функционального состояния организма крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке

Результаты исследования представлены в [17, 18]. Общее состояние всех животных по внешнему виду, качеству шерстного покрова, потреблению корма и воды и поведению при ежедневном осмотре на протяжении всего эксперимента было удовлетворительным.

Среднее кумулятивное потребление корма животными всех групп достоверно не различалось. Расчетное потребление 20Е в составе пищевого ингредиента 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.

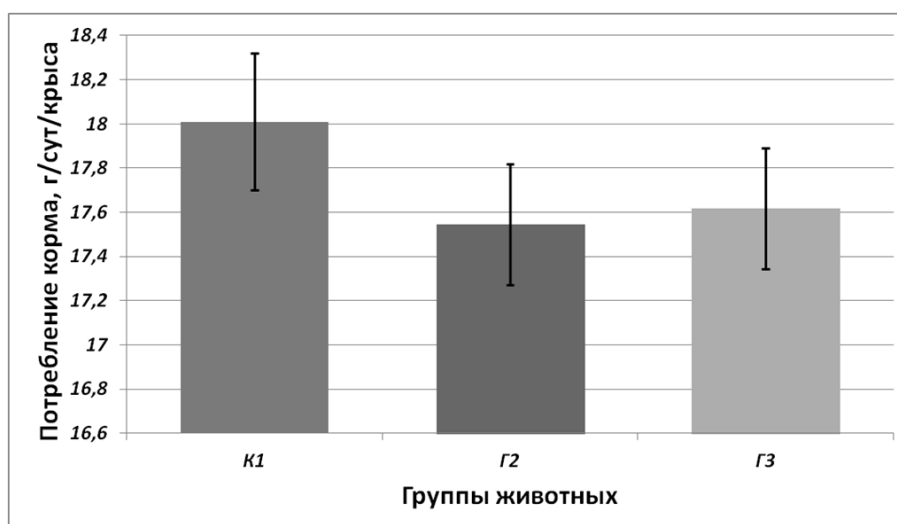
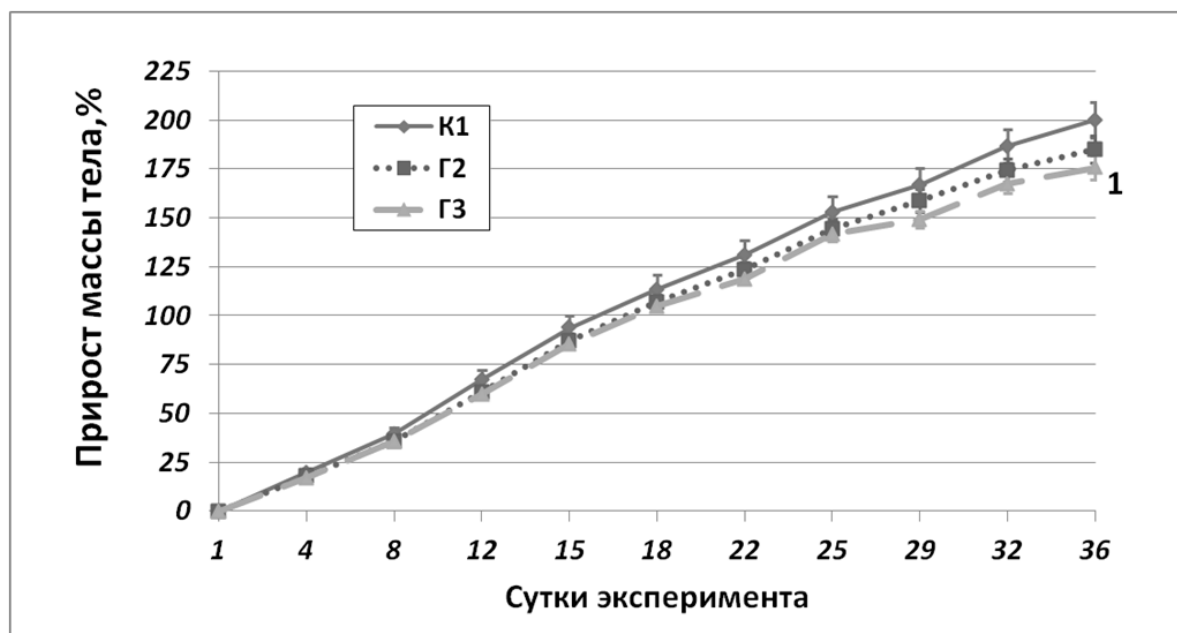


Рисунок 42 – Потребление корма животными, г/сут/крыса

Прирост массы тела животных всех групп достоверно не отличался до 36 суток эксперимента (рис. 43). На 36 сутки эксперимента прирост массы тела животных группы Г3 был достоверно ниже по сравнению с животными группы К1 ($p < 0,05$).

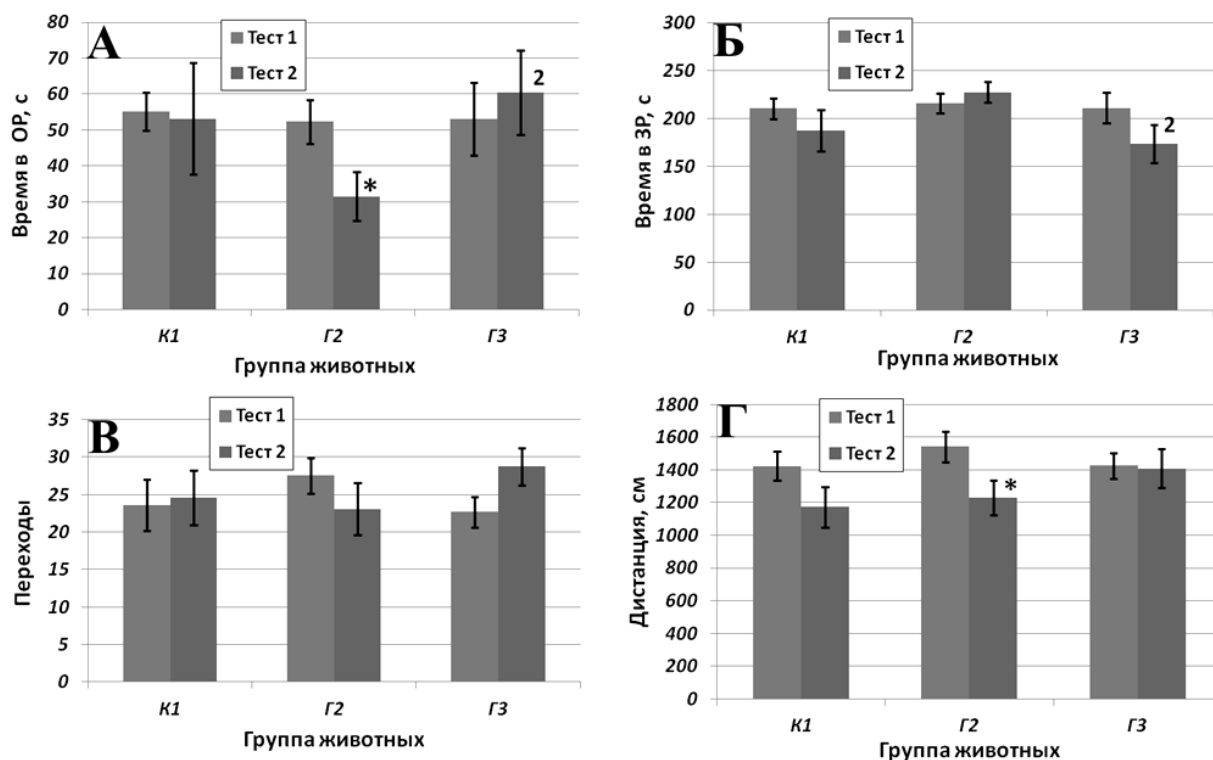


Примечание – 1 – различия достоверны с группой К1, $p < 0,05$.

Рисунок 43 – Прирост массы тела животных, %

При первом тестировании на установке ПКЛ (0 сутки, рис. 44), 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.



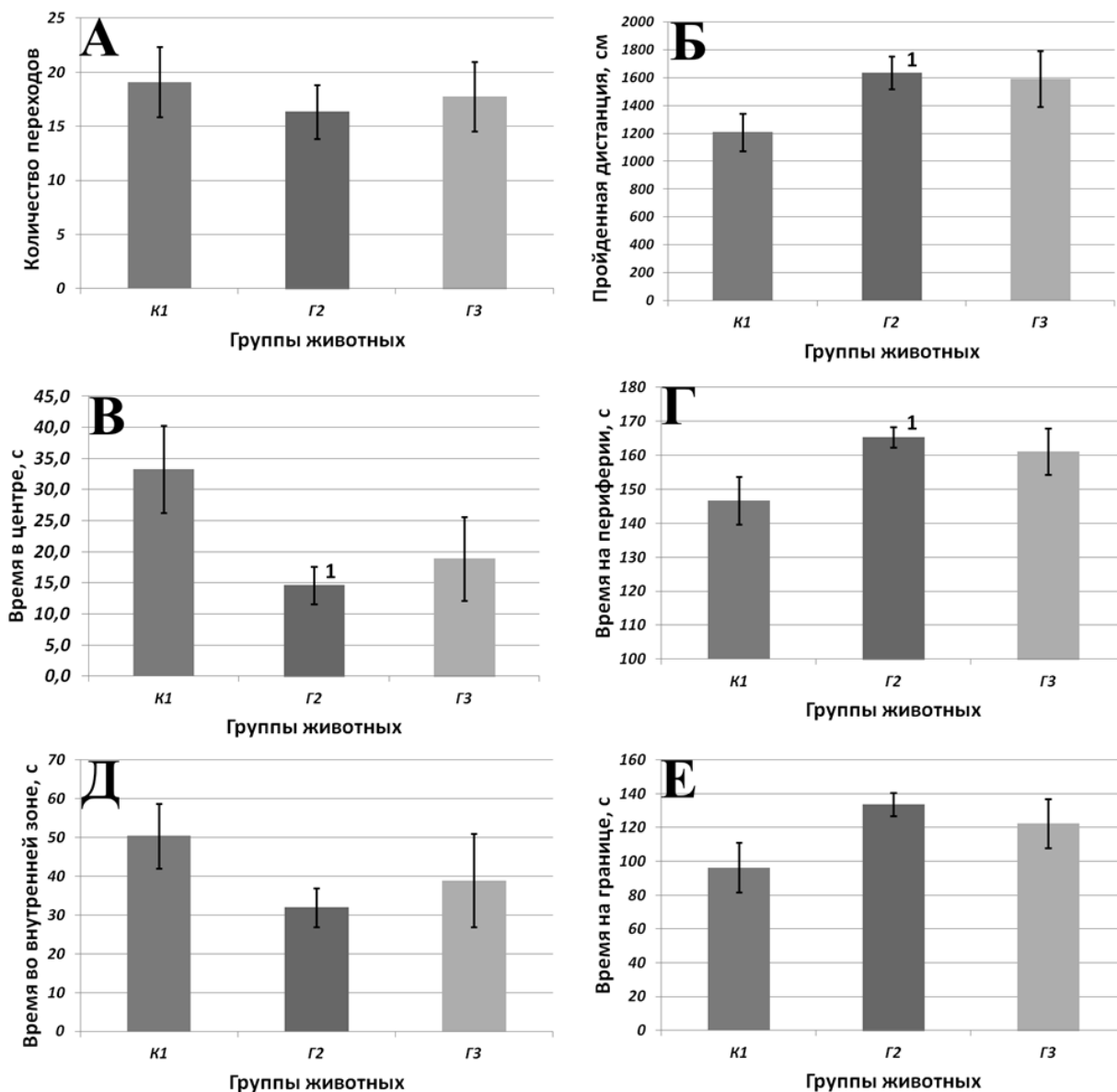
Примечание – * – различия достоверны по сравнению с первым тестированием; 2- различия достоверны по сравнению с группой Г2 в соответствующий день теста ($p < 0,05$).

Рисунок 44 – Результаты теста ПКЛ, А – время в открытых рукавах, с; Б – время в закрытых рукавах, с; В – количество переходов; Г – пройденная дистанция, см.

При вторичном тестировании животные опытной группы Г2 достоверно меньше времени проводили в ОР, общая пройденная дистанция у них также была достоверно ниже по сравнению с первым тестированием. 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, наоборот

проводили достоверно больше времени в ОР и достоверно меньше времени в ЗР лабиринта в отличие от животных группы Г2 ($p < 0,05$).

Далее на рисунке 45 (А.Б.В.Г.Д.Е) представлены результаты теста Открытое поле после 22 суток кормления животных экспериментальными рационами.



Примечания – 1 – различия достоверны по сравнению с контрольной группой К1.

Рисунок 45 – Результаты теста открытое поле

По показателям тревожности (рис.45 В.Г.Д.Е.) выявлено, что животные группы Г2, подверженные еженедельным физическим упражнениям, достоверно меньше времени проводили в центре лабиринта и соответственно

больше времени в зоне периферии по сравнению с животными групп К1 и Г3, что может свидетельствовать о повышенной тревожности животных этих двух групп. При этом животные группы Г2 достоверно больше перемещались по лабиринту (рис.45.Б) по сравнению с животными контрольной группы К1. 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 повышала тревожность лабораторных животных. Введение в рацион пищевого ингредиента 3 нивелировало влияние регулярных беговых нагрузок на тревожность животных, оказывая выраженный анксиолитический эффект.

Результаты тестирования УРПИ представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты тестирования краткосрочной и долгосрочной памяти

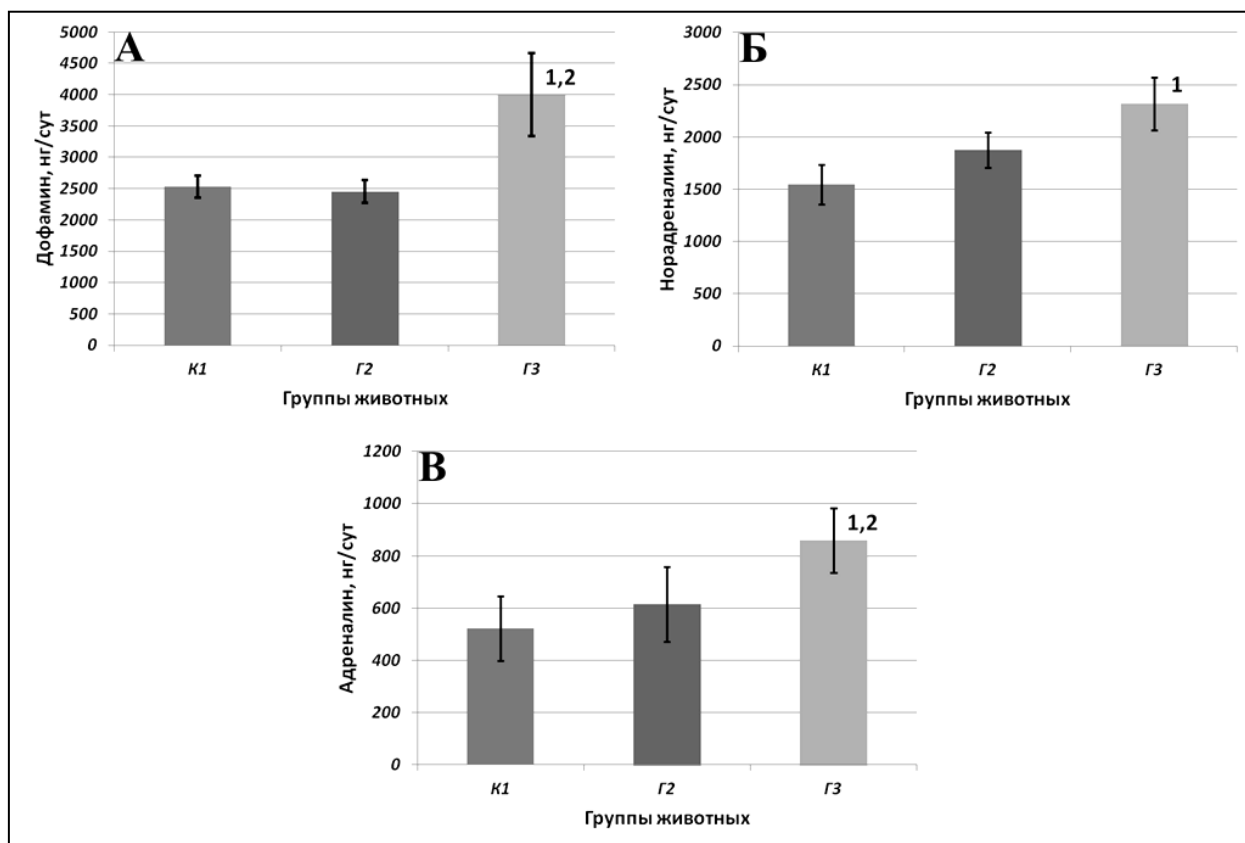
Группы	Время пребывания, с					
	Первый тест (выработка УРПИ)		Второе тестирование (через 24 часа) Краткосрочная память		Третье тестирование (2 недели) Долгосрочная память	
	Время входа, с	Не вошедшие животные (исключены из теста)	Время входа, с	Число вошедших животных	Время входа, с	Число вошедших животных
К1	67±20	2(12)	164±16	1(10%)	152±17	3(30%)
Г2	40±14	1(12)	110±24	5(45%)	84±25*	7(64%)
Г3	39±14	1(12)	150±20	2(18%)	122±20	6(54%)

Примечание – *различия достоверны по сравнению с группой К1; вошедшие животные – это животные, которые зашли в темный отсек установки (см. раздел 2.6).

Во время первого тестирования – выработки УРПИ, во всех группах присутствовали животные, не входившие в темный отсек камеры (от одного до двух) и исключенные из дальнейшего тестирования. На 2е сутки тестирования краткосрочной памяти достоверных отличий между группами не выявлено. На 14е сутки тестирования долгосрочной памяти латентное время входа в темный отсек камеры животными опытной группы Г2 было

достоверно ниже по сравнению с контрольной группой К1, что может говорить о влиянии регулярных физических нагрузок на долгосрочную память крыс. Латентное время входа животными опытной группы Г3 достоверно не отличалось от показателя животных контрольной группы К1. Полученный результат свидетельствует об улучшении долгосрочной памяти у подверженных регулярным физическим нагрузкам животных, получавших пищевой ингредиент 3

Далее на рисунке 46 представлены результаты определения суточной экскреции катехоламинов с мочой после истощающей физической нагрузки бегом.



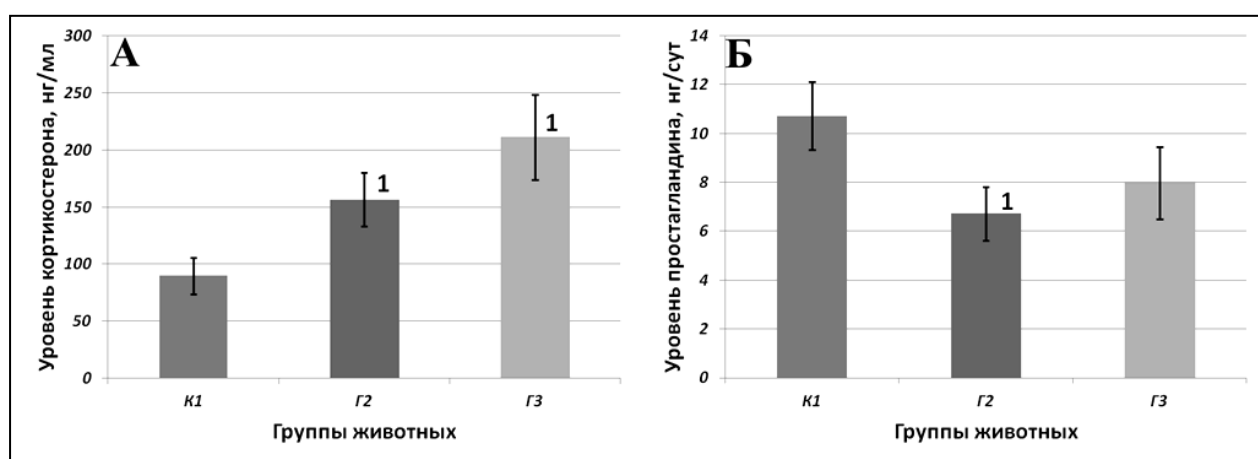
Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1; 2 – различия достоверны по сравнению с группой Г2 ($p < 0,05$).

Рисунок 46 – 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 47 представлены результаты определения уровня кортикостерона в сыворотке крови животных и суточной экскреции простагландина Е2 с мочой животных после истощающей физической нагрузки



Примечание – 1 – различия достоверны по сравнению с группой К1

Рисунок 47 – Кортикостерон, нг/мл и простагландин, нг/сутки

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 Е2 с мочой животных группы Г2 достоверно снизилась по сравнению с аналогичным показателем для животных группы К1. Однако значения суточной экскреции простагландина Е2 с мочой у животных группы Г3 и К1 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 [79, 95].

Существует понятие состояния неспецифической сопротивляемости организма (СНПС), которое было определено еще в конце пятидесятих годов прошлого века отечественным ученым Н.В. Лазаревым как состояние организма, позволяющее ему «избежать» стадии истощения вследствие повышенной устойчивости организма к различным неблагоприятным воздействиям [5]. СНПС оказывает регулирующее воздействие, оптимизирующее развитие ОАС, не являясь собственно фазой стресса. Достижение состояния 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 таблице 18 представлены результаты определения некоторых биохимических показателей крови животных через сутки после истощающей физической нагрузки бегом.

Таблица 18 – Биохимические показатели крови животных.

Показатель	Группы животных		
	К1	Г2	Г3
Общий белок, г/л	64,8±0,7	65,0±1,1	63,9±1,1
Мочевина, ммоль/л	5,07±0,23	4,79±0,28	4,72±0,19
Креатинин, мкмоль/л	38,4±2,2	38,3±1,4	38,6±1,7
Холестерин, ммоль/л	2,14±0,13	1,88±0,11	1,94±0,15
ЛПВП, ммоль/л	0,68±0,06	0,70±0,04	0,71±0,05
ЛПНП, ммоль/л	0,21±0,02	0,20±0,03	0,19±0,02
Триглицериды, ммоль/л	1,27±0,16	1,08±0,11	0,81±0,08^{1,2}
Мочевая кислота, ммоль/л	132,6±9,5	106,9±10,8¹	105,2±7,4¹
Фосфор, ммоль/л	3,19±0,08	3,19±0,08	3,22±0,09
Магний, ммоль/л	0,93±0,04	0,90±0,04	0,81±0,02^{1,2}
Кальций, ммоль/л	2,55±0,04	2,61±0,06	2,62±0,05
Билирубин общий, мкмоль/л	5,15±0,56	4,36±0,26	4,14±0,39
АЛТ, Ед./л	53,4±3,7	49,6±4,3	52,9±3,3
АСТ, Ед./л	185,4±24,6	175,9±13,5	243,7±19,4²
АСТ/АЛТ	3,62±0,45	3,87±0,39	4,63±0,27
Щелочная фосфатаза, Ед./л	201,7±16,4	245,9±28,6	179,8±14,4²
Глюкоза, ммоль/л	4,44±0,23	4,95±0,20	4,63±0,26

Примечание:

1 – различия достоверны с группой К1; 2 – различия достоверны с группой Г2.

В крови животных группы Г3 отмечено достоверное снижение уровня триглицеридов по сравнению с животными групп К1 и Г2, что может говорить об определенном гиполипидемическом эффекте пищевого ингредиента З.

У животных групп Г2 и Г3, подвергавшихся истощающей физической нагрузке, отмечено достоверное снижение уровня мочевой кислоты в крови.

В крови животных группы Г3 отмечено достоверное увеличение уровня АСТ по сравнению с показателем у животных групп К1 и Г2, что согласуется с данными предыдущего эксперимента. АСТ активизирует цикл Кребса за счет увеличения количества ЩУК, соответственно АСТ служит универсальным показателем интенсивности катаболизма на конечных его этапах. Поэтому во время интенсивных мышечных нагрузок, голодания, лихорадки, при старении или на фоне кахексии доминирует активность АСТ.

Соответственно повышение величины коэффициента де Ритиса указывает на усиление процессов катаболизма. В нашем исследовании коэффициент де Ритиса для здоровых животных группы К1 составил 3,6, для

стрессированных животных группы Г3, получавших Концентрат 3 – 4,6, для стрессированных животных группы Г2 – 3,9.

Выявленное увеличение уровня АСТ на фоне потребления пищевого ингредиента 3 может выступать маркером интенсификации цикла трикарбоновых кислот, таким образом, увеличивая выработку энергии в ответ на беговую нагрузку, которой подвергались эти животные [13].

Также в крови животных группы Г3 отмечено достоверное снижение уровня щелочной фосфатазы по сравнению с группой Г2.

Интересно, что нами было выявлено достоверное повышение уровня катехоламинов в моче животных, потреблявших пищевой ингредиент, 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 симпато-адреналовую ось.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перспективность, научно-практическая и социальная значимость направления по использованию биологически активных компонентов пищи в качестве функциональных пищевых ингредиентов специализированных пищевых продуктов для диетической профилактики или коррекции нарушений углеводного и липидного обмена и повышения антистрессорной устойчивости организма человека определили комплекс исследований, проведенных в рамках выполнения данной диссертационной работы. Были применены физико-химические методы препаративного выделения растительных минорных БАВ, их концентрирования на полимерных белково-углеводных и белковых пищевых матрицах и проведена физиолого-биохимическая экспериментальная оценка *in vivo* (в условиях соответствующего биомоделирования) эффективности полученных пищевых ингредиентов в питании лабораторных грызунов.

Низкая биодоступность, снижающая эффективность использования полифенольных соединений в профилактических целях, обусловила на первом этапе диссертационной работы проведение экспериментов по подбору оптимальных параметров сорбции полифенолов, экстрагируемых из листьев черники на гречневой муке (концентрации раствора экстракта, соотношения раствор/сорбент, значения рН раствора, температуры и времени сорбции.). В ходе экспериментов определены оптимальные условия сорбции полифенолов экстракта листьев черники на гречневой муке (инкубации 2% раствора ЭЛЧ (рН 3,6) с навеской гречневой муки в соотношении 1г/50 мл раствора в течение 45 мин при 25°C). Анализ представленной в обзоре научной литературы (раздел 1.3), посвященной современным подходам, направленным на повышение всасывания и биодоступности полифенолов пищи позволил выбрать метод сорбции экстрагируемых полифенольных соединений на измельченной гречневой муке, позволяющий не только концентрировать полифенольные соединения, но и одновременно повышать их устойчивость к деградации при хранении [85, 124, 125, 126]. Это

подтверждают результаты по сравнительной оценке влияние свето- и температурно-влажностного воздействия на полифенольные соединения в сухом ЭЛЧ и в составе пищевого ингредиента 1 в процессе хранения. Полученные результаты согласуются с результатами работы [124], в которой полифенолы в составе комплекса с соевой мукой сохраняли биологические свойства в течение 20 недель после получения.

На основании данных по зависимости сорбции полифенолов от концентрации раствора экстракта, соотношения раствор/сорбент, значения рН раствора, температуры и времени смешивания определены условия получения пищевого ингредиента 2 - концентрата полифенолов ягод черники с измельченной гречневой мукой: при постоянном перемешивании смеси экстракта ягод и гречневой муки в соотношении 15:1 в течение 1 часа при температуре 25°C. Получение пищевого ингредиента при данных условиях исключило сорбцию моно- и дисахаридов из экстракта ягод на гречневой муке. Аналогичный результат представлен в работах [124, 125], в которых моно-, ди- и олигосахариды из сока черники и экстракта винограда не связывались с обезжиренной соевой мукой, используемой в качестве матрицы.

В ходе выполнения работы с применением комплекса физико-химических методов препаративного выделения и концентрирования, включающих экстракцию, мембранные технологии, измельчение, коагуляцию и сорбцию получен пищевой ингредиент 3 - концентрат 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца. Выбор коагулированного белка в качестве матрикса обоснован его высокой биологической ценностью [15]. Пищевой ингредиент получали 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. Использованный технологический подход позволил сконцентрировать 20-гидроксиэкдизон и

флавоноиды в составе концентрата более чем в 20 и 50 раз по сравнению с их исходным содержанием в зерне. Применимость мембранных технологий для концентрирования биологически активных веществ подтверждается рядом современных публикаций [30, 35, 41].

Для доклинической оценки применимости использованных способов концентрирования минорных БАВ на полимерных пищевых матрицах с целью дальнейшего использования в качестве ингредиентов специализированных пищевых продуктов проведены сравнительные физиолого-биохимические исследования их биологической активности в опытах *in vivo*.

С использованием физиологических и биохимических методов охарактеризованы гипогликемические и гиполипидемические эффекты пищевых ингредиентов 1 и 2 - концентратов полифенолов листьев или ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, при нарушениях углеводного и липидного обмена у мышей-самцов линии C57Bl/6, индуцированных потреблением ВЖВУ рациона. Установлено достоверное снижение уровня глюкозы крови животных, получавших пищевые ингредиенты относительно показателя животных группы сравнения. Согласно [81], 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 транспортера глюкозы посредством стимуляции сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) и активации ферментов PI3K и 5'-аденозин монофосфат-активируемой протеинкиназы (AMPK) [163]. Потребление полифенолов листьев и ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, также снижало развитие инсулинорезистентности. Согласно [26] полифенольные соединения способны снижать инсулинорезистентность двумя путями: посредством инсулинотропных эффектов и усилением

сигнального пути инсулина. Применение методов ПЦР и вестерн-блота позволило выявить, что полифенолы проявляют антидиабетические свойства посредством постепенной активации PPAR γ /GLUT4 сигнального пути и снижения окислительного стресса [135]. На модели мышей-самцов с индуцированной инсулинорезистентностью показано, что рутин увеличивал активность (тирозинкиназного) рецептора инсулина, таким образом, усиливая инсулиновый сигнальный путь, что в свою очередь приводило к интенсификации переноса глюкозы GLUT4-транспортером [71].

У животных, получавших с рационом пищевые ингредиенты, отмечен достоверный рост потребления корма. Это позволяет предположить, что полифенолы в составе концентратов усиливали аппетит животных. Как показано в работе [84], потребление мышами-самцами линии C57Bl/6J высокожирового рациона с добавлением экстракта красной водоросли *Gelidium amansii* (17,4 мг полифенолов/г экстракта) в количестве 250 мг/кг массы тела способствовало большему потреблению корма, по сравнению с животными группы сравнения, потреблявшими только высокожировой рацион.

Установлено регулирующее влияние полифенолов листьев и ягод черники, сорбированных на гречневой муке, на уровни лептина, грелина и инсулина в крови мышей-самцов линии C57Bl/6. В исследовании [109] подтверждается опосредованное влияние полифенолов на уровни лептина и грелина крови, что согласуется с результатом, полученном в нашем эксперименте. 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 [129]. Введение в рацион экстракта картофеля *Solanum tuberosum* L. с высоким содержанием хлорогеновой и феруловой кислот способствовало росту уровня грелина у мышей (самцов и самок)

линии C57Bl/6J на фоне высокожирового рациона [85]. Полученные в ходе исследования результаты согласуются с данными представленными в работе [91], в которой у мышей-самцов линии Swiss Webster на фоне высокожирового рациона было показано увеличение массы тела, 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 схожей работе тех же авторов [99] ксантогумол снижал уровни как лептина, так и инсулина в крови мышей-самцов линии C57Bl/6J, получавших высокожировой рацион, по сравнению с тучным контролем. В работе [156] у крыс-самцов линии Sprague Dawley, получавших полифенолы зеленого чая на фоне высокожировой диеты, также показано снижение инсулина крови.

Применение принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузки в качестве моделей стрессорного воздействия приводит к увеличению в крови уровня основного медиатора стресс-системы – кортикостерона [136].

Проведена оценка антистрессорных и гиполипидемических эффектов пищевого ингредиента 3 - концентрата 20-гидроксиэкдизона и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, на организм крыс-самцов линии Вистар, подверженных принудительной иммобилизации.

У иммобилизованных животных отмечено достоверное отставание в приросте массы тела по сравнению с группой интактных животных. Полученный результат согласуется с данными работы [18], в которой принудительная иммобилизация привела к достоверному снижению прироста массы тела крыс-самцов линии Вистар.

Введение в рацион пищевого ингредиента 3 в течение 35 суток способствовало снижению тревожности животных. Аналогичный результат

получен в работе [59], в которой потребление 20Е-содержащего экстракта *Pfaffia glomerata* (Spreng.) мышами-самцами линии C57Bl/6J снижало тревожность животных, оцениваемую в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт.

Потребление пищевого ингредиента 3 на протяжении 35 суток достоверно снижало экскрецию катехоламинов с мочой. 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 [60, 144]. 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, направленном на сглаживание ответной реакции организма на сильный стресс.

В крови животных, получавших пищевой ингредиент 3 показано достоверное повышение уровня АСТ по сравнению с животными групп сравнения (в 1,4 и 1,9 раза соответственно), а также повышения АЛТ относительно интактных животных (в 1,2 раза). АСТ и АЛТ находятся во взаимосвязанных соотношениях. При этом АЛТ в большей мере отображает уровень анаболизма, АСТ, наоборот, - интенсивность катаболизма. Для суждения о соотношении ката- и анаболизма вычисляют коэффициент де Ритиса – АСТ/АЛТ. При этом в здоровом организме катаболизм преобладает над анаболизмом [13].

Известно, что под влиянием адаптогенов активируются адаптивные реакции со стороны гомеостатических систем, что, соответственно, повышает общую резистентность организма, т.е. адаптоген, сам по себе,

выступает в роли прострессора. Потребление пищевого ингредиента 3 животными группы Г3 приводило к увеличению уровней АЛТ и АСТ, нивелируя таким образом отрицательное влияние принудительной иммобилизации на баланс катаболических и анаболических процессов в организме крыс, что выражается в отсутствии достоверных различий коэффициента де Ритиса между контрольной группой К1 и опытной группой Г3 при достоверном его падении для крыс группы Г2.

Изучены антистрессорные эффекты потребления пищевого ингредиента 3 на организм крыс линии Вистар при истощающей физической нагрузке. Выявлен рост экскреции дофамина и адреналина с мочой у животных получавших пищевой ингредиент при отсутствии влияния на уровень кортикостерона в крови.

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 [79, 95].

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 [5]. СНПС оказывает регулирующее воздействие, оптимизирующее развитие ОАС, не являясь собственно фазой стресса. Достижение состояния 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.

Интересно, что нами было выявлено достоверное повышение уровня катехоламинов в моче животных, потреблявших пищевой ингредиент, на фоне истощающей физической нагрузки [45, 82], 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 симпато-адреналовую ось.

Стоит отметить, что введение в рацион пищевого ингредиента 3 - концентрата 20Е и флавоноидов, сорбированного на коагулированном белке куриного яйца, оказывало гипополипидемический эффект, путем регуляции уровней триглицеридов, ЛПВП и ЛПНП. В работе [39] внутрижелудочное введение 20Е в дозе 20 мг/кг массы тела крысам-самкам линии Sprague-Dawley на фоне потребления высокожировой высокофруктозной диеты приводило к снижению уровня ЛПНП в крови животных. Помимо этого, эффекты концентрата на липидный обмен определяются высоким содержанием флавоноидов в его составе. Так, флавоноиды, экстрагированные из *Asteriscus graveolens*, способствовали снижению уровней общего холестерина и триглицеридов, а также повышению уровня ЛПВП в крови крыс с индуцированным введением стрептозотоцина диабетом [54]. В исследовании [77] кверцетин, вводимый в дозе 12,5 мг/кг массы тела, приводил к достоверному снижению уровней общего холестерина и ЛПНП в крови мышей-самцов линии apoE^{-/-} на фоне потребления высокожирового рациона.

Таким образом, в рамках выполнения диссертационной работы получены пищевые ингредиенты 1 и 2 - концентраты полифенолов листьев или ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке, оказывающие гипогликемические и гипополипидемические эффекты на модели

мышей линии C57Bl/6 с индуцированными нарушениями углеводного и липидного обмена. Получен пищевой ингредиент 3 - концентрат 20Е и флавоноидов зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца, установлено противострессорное действие пищевого ингредиента 3, выражающееся в регуляции уровней стресс-маркеров – катехоламинов на двух моделях стресса: принудительной иммобилизации и истощающей физической нагрузке. Потребление пищевого ингредиента 3 также оказывало положительный эффект на липидный обмен животных путем регуляции уровней триглицеридов, ЛПВП и ЛПНП.

5 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-гидроксиэдизона 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 $23,7 \pm 0,5$ 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-гидроксиэдизона 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-

гидроксиэкдизона и общее содержание флавоноидов составили соответственно $3,4 \pm 0,3$ мг/г и $14,1 \pm 1,4$ мг/г концентрата. Используемый технологический подход позволил сконцентрировать 20-гидроксиэкдизон и флавоноиды в составе концентрата более чем в 20 и 50 раз по сравнению с их исходным содержанием в зерне.

5. Разработаны и верифицированы две модели стрессорного воздействия на крыс-самцов линии Вистар: первая модель - принудительная иммобилизация (ежедневная 40 минутная в течение 35 суток и однократная 3-часовая иммобилизация в последний день эксперимента); вторая модель - истощающая физическая нагрузка 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 C57Bl/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 C57Bl/6 с нарушениями углеводного и липидного обмена, индуцированными ВЖВУ рационом, также оказало достоверное ($p < 0,05$) гипогликемическое и гиполипидемическое 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 гиполипидемическое 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.

6 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. – М.: Стандартинформ, 2014. – 20 с.
2. Жилкина В.Ю., Марахова А.И., Кезимана П., Блынская Е.В. Фитосомы – инновационная технология доставки растительных компонентов // Успехи современного естествознания. - 2015. - № 11. - С. 31-34.
3. Жогова А.А., Перова И.Б., Самылина И.А. и др. Идентификация и количественное определение основных биологически активных веществ травы пустырника с помощью ВЭЖХ-масс-спектрометрии // Химико-фармацевтический журнал. - 2014. - Т. 48, №7. - С. 54-59.
4. Калимуллин М.И., Сади С.-С.С.-о., Австриевских А.Н., Позняковский В.М. Новый высокотехнологичный биокомплекс для коррекции обменных нарушений при сахарном диабете // Новые технологии. – 2019. – Т. 47, №1. – С. 77-88. doi: 10.24411/2072-0920-2019-1010
5. Лазарев Н.В., Люблина Е.И., Розин М.А. Состояние Неспецифически Повышенной Сопротивляемости // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1959. – Т.3, вып.4. – С. 16-21.
6. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В., Петрова М.Б. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома (обзор литературы) // Верхневолжский медицинский журнал. - 2015. - Т. 4, №2. - С.34-39.
7. 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.
8. Мазо В.К., Сидорова Ю.С., Саркисян В.А., Киселева Т.Л., Кочеткова А.А. Перспективы использования растительных полифенолов в качестве функциональных пищевых ингредиентов // Вопросы питания. - 2018. - Т. 87, № 6. - С. 57-66.

9. Макарова М.Н., Макаров В.Г. Молекулярная биология флавоноидов (химия, биохимия, фармакология): Руководство для врачей. СПб., 2010. 428 с.
10. Методы анализа минорных биологически активных веществ пищи / под ред. В.А. Тутельяна и К.И.Эллера. – М.: Издательство «Династия», 2010. – 160с.
11. Морозова В.Е., Макарова Л.М., Погорелый В.Е., Мечикова Г.Я., Степанова Т.А. Изучение гипогликемической и глюкозурической активности настоев черники пазушной, черники волосистой и голубики // Дальневосточный медицинский журнал. – 2005. - №1. – С. 67-70.
12. 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 // Вопр. питания. - 2019. - Т. 88, № 6. - С. 68-72. doi: 10.24411/0042-8833-2019-10066
13. Рослый И.М., Водолажская М.Г. Правила чтения биохимического анализа: Руководство для врача /. – 2-изд., испр. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2014. – 100 с.: ил.
14. Сидорова А.А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови/А.А. Сидорова, Л.А Карцова//Сорбционные и хроматографические процессы.- 2009.- Т. 9.- Вып. 6.- с. 774-782
15. Сидорова Ю.С., Мазо В.К., Зорин С.Н., Стефанова И.Л. Оценка биологической ценности и антигенности коагулированного белка куриного яйца // Вопр. питания. - 2019. - Т. 87, № 1. - С. 44-50. doi: 10.24411/0042-8833-2018-10005
16. 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.

17. 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.
18. 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. doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-3-290-295
19. 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.
20. 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.
21. Соловьёва А.Г., Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В., Федорова А.В., Михайлов В.В. Физиологические механизмы действия и перспективы применения фитостероидов в медико-биологических технологиях // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2021. - № 1. – С. 26-40. doi: 0.25687/1996-6733.prodanimbiol.2021.1.26-40
22. Тутельян В.А. Пищевые ингредиенты в создании современных продуктов питания / А.П. Нечаев, О.В. Багрянцева, В.А.Тутельян. - М: изд. ДеЛи плюс.- 2013.- 520стр
23. Abdelaleem M.A., Elbassiony K.R.A. Evaluation of phytochemicals and antioxidant activity of gamma irradiated quinoa (*Chenopodium quinoa*) // Braz J Biol. – 2021. – V. 81, N 3. P. 806-813. doi: 10.1590/1519-6984.232270

24. Abellán Ruiz M.S., Barnuevo Espinosa M.D., García Santamaría C., et al. Effect of quinoa (*Chenopodium quinoa*) consumption as a coadjuvant in nutritional intervention in prediabetic subjects // *Nutr. Hosp.* – 2017. - V. 34, N 5. – P. 1163-1169. DOI: 10.20960/nh.843
25. Ábrigo J., Elorza A.A., Riedel C.A., Vilos C., Simon F., Cabrera D., Estrada L., Cabello-Verrugio C. Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – N 2018. – P. 2063179. doi: 10.1155/2018/2063179
26. Ahmed O.M., Hassan M.A., Abdel-Twab S.M., Azeem M.N.A. Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have anti-diabetic potentials in type 2 diabetic rats // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2017. - N 94. – P. 197–205. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.094.
27. Ahrens S., Wu M.V., Furlan A., Hwang G.R., Paik R., Li H., Penzo M.A., Tollkuhn J., Li B. A Central Extended Amygdala Circuit That Modulates Anxiety // *J Neurosci.* – 2018/ - V. 38, N 24. - P. 5567-5583. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0705-18.2018
28. Alharbi W.S., Almughem F.A., Almeahmady A.M., Jarallah S.J., Alsharif W.K., Alzahrani N.M., Alshehri A.A. Phytosomes as an Emerging Nanotechnology Platform for the Topical Delivery of Bioactive Phytochemicals // *Pharmaceutics.* – 2021. – V. 13, N 9. – P. 1475. doi: 10.3390/pharmaceutics13091475
29. Antognoni F., Potente G., Biondi S., Mandrioli R., Marincich L., Ruiz K.B. Free and Conjugated Phenolic Profiles and Antioxidant Activity in Quinoa Seeds and Their Relationship with Genotype and Environment // *Plants (Basel).* – 2021. – V. 10, N 6. – P. 1046. doi: 10.3390/plants10061046
30. Argenta A.B., De Lima J.J., Nogueira A., Scheer A.P. Evaluation of concentration process of bovine, goat and buffalo whey proteins by ultrafiltration // *J Food Sci Technol.* – 2021. – V. 58, N 5. – P. 1663-1672. doi: 10.1007/s13197-020-04675-0

31. Baba W.N., McClements D.J., Maqsood S. Whey protein-polyphenol conjugates and complexes: Production, characterization, and applications // *Food Chem.* – 2021. – V. 365. – P. 130455. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130455
32. Baev A.Y., Charishnikova O.S., Khasanov F.A., Nebesnaya K.S., Makhmudov A.R., Rakhmedova M.T., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N., Levitskaya Y.V. Ecdysterone prevents negative effect of acute immobilization stress on energy metabolism of rat liver mitochondria // *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2022. – V. 219. – P. 106066. doi: 10.1016/j.jsbmb.2022.106066
33. Bandyopadhyay P., Ghosh A.K., Ghosh C. Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system // *Food Funct.* – 2012. – V. 3, N 6. – P. 592. doi:10.1039/c2fo00006g.
34. Bhandarkar N.S., Brown L., Panchal S.K. Chlorogenic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced cardiovascular, liver, and metabolic changes in rats // *Nutr Res.* – 2019. – V. 62. – P. 78-88. doi: 10.1016/j.nutres.2018.11.002
35. Bhattacharjee C., Saxena V.K., Dutta S. Watermelon juice concentration using ultrafiltration: Analysis of sugar and ascorbic acid // *Food Sci Technol Int.* – 2017. – V. 23, N 7. P. 637-645. doi: 10.1177/1082013217714672
36. Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability // *NutrRev.* – 2014. - V. 72, N 7. - P. 429-452. doi: 10.1111/nure.12114
37. Boussahel S., Cacciola F., Dahamna S., Mondello L., Saija A., Cimino F., Speciale A., Cristani M. Flavonoid profile, antioxidant and antiglycation properties of *Retama sphaerocarpa* fruits extracts // *Nat Prod Res.* – 2018. – V. 32, N 16. - P. 1911-1919. doi: 10.1080/14786419.2017.1356835
38. Brasanac-Vukanovic S., Mutic J., Stankovic D.M., Arsic I., Blagojevic N., Vukasinovic-Pesic V., Tadic V.M. Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro as a Source of Antioxidants for Use in the Production of Nutraceuticals // *Molecules.* 2018. – V. 23, N 8. – P. 1864. doi: 10.3390/molecules23081864

39. Buniam J., Chukijrungrat N., Rattanavichit Y., Surapongchai J., Weerachayaphorn J., Bupha-Intr T., Saengsirisuwan V. 20-Hydroxyecdysone ameliorates metabolic and cardiovascular dysfunction in high-fat-high-fructose-fed ovariectomized rats // *BMC Complement Med Ther.* – 2020. – V. 20, N 1. - P. 140. doi: 10.1186/s12906-020-02936-1
40. Cao H., Liu X., Ulrich N.P., Sengupta P.K., Xiao J. Plasma protein binding of dietary polyphenols to human serum albumin: A high performance affinity chromatography approach // *Food Chem.* 2019. – V. 270. – P. 257-263. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.07.111
41. Castro-Muñoz R., Conidi C., Cassano A. Membrane-based technologies for meeting the recovery of biologically active compounds from foods and their by-products // *Crit Rev Food Sci Nutr.* – 2019. – V. 59, N 18. – P. 2927-2948. doi: 10.1080/10408398.2018.1478796
42. Chang J., Reiner J., Xie J. Progress on the chemistry of dibenzocyclooctadiene lignans // *Chem Rev.* 2005. – V. 105, N 12. P. 4581-4609. doi: 10.1021/cr050531b
43. Chen G., Wang S., Feng B., Jiang B., Miao M. Interaction between soybean protein and tea polyphenols under high pressure // *Food Chem.* – 2019. – V. 277. – P. 632-638. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.024
44. Chen X., He X., Sun J., Wang Z. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, α -Glucosidase and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Quinoa Extract and Its Fractions // *Molecules.* – 2022. – V. 27, N 8. - P. 2420. doi: 10.3390/molecules27082420
45. Cordeiro L.M.S., Rabelo P.C.R., Moraes M.M., Teixeira-Coelho F., Coimbra C.C., Wanner S.P., Soares D.D. Physical exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems // *Braz J Med Biol Res.* - 2017. – V. 50, N 12. – P. e6432. doi: 10.1590/1414-431X20176432
46. Dare A.P., Günther C.S., Grey A.C., Guo G., Demarais N.J., Cordiner S., McGhie T.K., Bolding H., Hunt M., Deng C., Karppinen K., Jaakola L., Espley R.V. Resolving the developmental distribution patterns of polyphenols and

related primary metabolites in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fruit // *Food Chem.* – 2022. – V. 374. – P. 131703. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131703

47. Das N., Mishra S.K., Bishayee A., Ali E.S., Bishayee A. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review // *Acta Pharm Sin B.* – 2021. – V. 11, N 7. – P. 1740-1766. doi: 10.1016/j.apsb.2020.10.012

48. Derakhshanian H., Djalali M., Djazayeri A., Javanbakht M.H., Zarei M., Hekmatdoost A., Eslamian G., Mirhashemi S.S., Dehpour A.R. Quercetin Ameliorates Lipid and Apolipoprotein Profile in High-Dose Glucocorticoid Treated Rats // *Arq Bras Cardiol.* – 2020. – V. 115, N 1. – P. 102-108. doi: 10.36660/abc.20180397

49. Deseo M.A., Elkins A., Rochfort S., Kitchen B. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract // *Food Chem.* – 2020. – V. 314. – P. 126180. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126180

50. Di Costanzo A., Angelico R. Formulation Strategies for Enhancing the Bioavailability of Silymarin: The State of the Art // *Molecules.* – 2019. – V. 24, N 11. – P. 2155. doi: 10.3390/molecules24112155

51. Dobrecky C., Marchini T., Ricco R., Garcés M., Gadano A., Carballo M., Wagner M., Lucangioli S., Evelson P. Antioxidant Activity of Flavonoid Rich Fraction of *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae) // *Chem Biodivers.* – 2020. – V. 17, N 10. – P. e2000302. doi: 10.1002/cbdv.202000302

52. Du P., Zhou J., Zhang L., Zhang J., Li N., Zhao C., Tu L., Zheng Y., Xia T., Luo J., Song J., Wang M. GC × GC-MS analysis and hypolipidemic effects of polyphenol extracts from Shanxi-aged vinegar in rats under a high fat diet // *Food Funct.* – 2020. – V. 11, N 9. – P. 7468-7480. doi: 10.1039/d0fo01266a

53. Earling M., Beadle T., Niemeyer E.D. Açai Berry (*Euterpe oleracea*) Dietary Supplements: Variations in Anthocyanin and Flavonoid Concentrations, Phenolic Contents, and Antioxidant Properties // *Plant Foods Hum Nutr.* – 2019. – V. 74, N 3. – P. 421-429. doi: 10.1007/s11130-019-00755-5

54. El-Ouady F., Bachir F., Eddouks M. Flavonoids Extracted from *Asteriscus graveolens* Improve Glucose Metabolism and Lipid Profile in Diabetic Rats // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. – 2021. – V. 21, N 5. – P. 895-904. doi: 10.2174/1871530320999200818103709
55. Engelke K., Museyko O., Wang L., Laredo J.D. Quantitative analysis of skeletal muscle by computed tomography imaging-State of the art // *J Orthop Translat*. – 2018. – N. 15. – P. 91-103. doi: 10.1016/j.jot.2018.10.004.
56. Filho A.M., Pirozi M.R., Da Silva Borges J.T., et al. Quinoa: Nutritional, Functional and Antinutritional Aspects // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. - 2015. - V. 57, N 8. – P. 1618-1630. doi: 10.1080/10408398.2014.1001811
57. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // *J Biol Chem*. – 1957. – V. 226, N 1. – P. 497-509.
58. Foucault A.S., Even P., Lafont R., Dioh W., Veillet S., Tomé D., Huneau J.F., Hermier D., Quignard-Boulangé A. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet // *Physiol Behav*. – 2014. – V. 128. – P. 226-31. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.02.002
59. Franco R.R., de Almeida Takata L., Chagas K., Justino A.B., Saraiva A.L., Goulart L.R., de Melo Rodrigues Ávila V., Otoni W.C., Espindola F.S., da Silva C.R.. A 20-hydroxyecdysone-enriched fraction from *Pfaffia glomerata* (Spreng.) pedersen roots alleviates stress, anxiety, and depression in mice // *J Ethnopharmacol*. – 2021. – V. 267. – P. 113599. doi: 10.1016/j.jep.2020.113599
60. Garafova A., Kornanova E., Chovancova D., Borovsky M., Karailiev P., Hlavacova N., Jezova D. Relationships between antenatal corticosteroids and catecholamine blood pressure support in neonates: considering of maternal stress-related diseases // *Stress*. – 2020. – V. 23, N 6. – P. 694-699. doi: 10.1080/10253890.2020.1806227
61. Gholipour P., Komaki A., Ramezani M., Parsa H. Effects of the combination of high-intensity interval training and Ecdysterone on learning and

memory abilities, antioxidant enzyme activities, and neuronal population in an Amyloid-beta-induced rat model of Alzheimer's disease // *Physiol Behav.* – 2022. – V. 251. – P. 113817. doi: 10.1016/j.physbeh.2022.113817

62. Gonzales G.B., Smaghe G., Grootaert C., Zotti M., Raes K., Camp J. Van. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure–activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity // *Drug Metab Rev.* – 2015. – V. 47, N 2. – P. 175–190. doi:10.3109/03602532.2014.1003649.

63. Grace M.H., Guzman I., Roopchand D.E., Moskal K., Cheng D.M., Pogrebnyak N., Raskin I., Howell A., Lila M.A. Stable binding of alternative protein-enriched food matrices with concentrated cranberry bioflavonoids for functional food applications // *J Agric Food Chem.* – 2013. – V. 61, N 28. – P. 6856-6864. doi: 10.1021/jf401627m

64. Graf B.L., Rojo L.E., Delatorre-Herrera J., Poulev A., Calfio C., Raskin I. Phytoecdysteroids and flavonoid glycosides among Chilean and commercial sources of *Chenopodium quinoa*: variation and correlation to physico-chemical characteristics // *J Sci Food Agric.* – 2016. – V. 96, N 2. – P. 633-643. doi: 10.1002/jsfa.7134

65. Han M.K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage // *Exp MolMed.* – 2003. – V. 35, N 2. – P. 136-139. doi: 10.1038/emm.2003.19

66. Han Y., Chi J., Zhang M., Zhang R., Fan S., Huang F., Xue K., Liu L. Characterization of saponins and phenolic compounds: antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase in different varieties of colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2019. – V. 83, N 11. – P. 2128-2139. doi: 10.1080/09168451.2019.1638756

67. Hanhineva K., Torronen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – V. 11, N 4. – P. 1365–1402. doi: 10.3390/ijms11041365

68. Herrera-Balandrano D.D., Chai Z., Hutabarat R.P., Beta T., Feng J., Ma K., Li D., Huang W. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of blueberry anthocyanins by AMPK activation: In vitro and in vivo studies // *Redox Biol.* – 2021. – V. 46. – P. 102100. doi: 10.1016/j.redox.2021.102100
69. Hirose Y., Fujita T., Ishii T., Ueno N. Antioxidative properties and flavonoid composition of *Chenopodium quinoa* seeds cultivated in Japan // *Food Chem.* – 2010. – V. 119, N 4. – P. 1300-1306. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.09.008
70. Hooper D.R., Orange T., Gruber M.T., Darakjian A.A., Conway K.L., Hausenblas H.A. Broad Spectrum Polyphenol Supplementation from Tart Cherry Extract on Markers of Recovery from Intense Resistance Exercise // *J Int Soc Sports Nutr.* – 2021. – V. 18, N 1. – P. 47. doi: 10.1186/s12970-021-00449-x.
71. Hsu, C. Y., H. Y. Shih, Y. C. Chia, C. H. Lee, H. Ashida, Y. K. Lai, and C. F. Weng. Rutin potentiates insulin receptor kinase to enhance insulin-dependent glucose transporter 4 translocation // *Molecular Nutrition & Food Research.* – 2014. – V. 58, N 6. – P. 1168–1176. doi: 10.1002/mnfr.201300691
72. Huang W., Hutabarat R.P., Chai Z., Zheng T., Zhang W., Li D. Antioxidant Blueberry Anthocyanins Induce Vasodilation via PI3K/Akt Signaling Pathway in High-Glucose-Induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 21, N 5. – P. 1575. doi: 10.3390/ijms21051575
73. Huang W., Yan Z., Li D., Ma Y., Zhou J., Sui Z. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Blueberry Anthocyanins on High Glucose-Induced Human Retinal Capillary Endothelial Cells // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – V. 2018. – P. 1862462. doi: 10.1155/2018/1862462
74. Isenmann E., Ambrosio G., Joseph J.F., Mazzarino M., de la Torre X., Zimmer P., Kazlauskas R., Goebel C., Botrè F., Diel P., Parr M.K. Ecdysteroids as non-conventional anabolic agent: performance enhancement by ecdysterone supplementation in humans // *Arch Toxicol.* – 2019. – V. 93, N 7. – P. 1807-1816. doi: 10.1007/s00204-019-02490-x

75. Ishikawa A., Yamashita H., Hiemori M., Inagaki E., Kimoto M., Okamoto M., Tsuji H., Memon A.N., Mohammadio A., Natori Y. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum* // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. – 2007. – N 53. – P. 166–173.
76. Jackson M.J. Reactive oxygen species in sarcopenia: Should we focus on excess oxidative damage or defective redox signalling? // *Mol Aspects Med.* – 2016. – N 50. – P. 33-40. doi: 10.1016/j.mam.2016.05.002
77. Jia Q., Cao H., Shen D., Li S., Yan L., Chen C., Xing S., Dou F. Quercetin protects against atherosclerosis by regulating the expression of PCSK9, CD36, PPAR γ , LXR α and ABCA1 // *Int J Mol Med.* – 2019. – V. 44, N 3. – P. 893-902. doi: 10.3892/ijmm.2019.4263
78. Jiao X., Wang Y., Lin Y., Lang Y., Li E., Zhang X., Zhang Q., Feng Y., Meng X., Li B. Blueberry polyphenols extract as a potential prebiotic with anti-obesity effects on C57BL/6 J mice by modulating the gut microbiota // *J Nutr Biochem.* – 2019. – V. 64. – P. 88-100. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.008
79. Juster R.P., McEwen B.S., Lupien S.J. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2010. – V. 35, N 1. – P. 2-16. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.10.002
80. Kanakis C.D., Hasni I., Bourassa P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Tajmir-Riahi H.A. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols // *Food Chem.* – 2011. – V. 127, N 3. – P. 1046-1055. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.079
81. Kim Y., Keogh J.B., Clifton P.M. Polyphenols and Glycemic Control // *Nutrients.* – 2016. – V. 8, N 1. – P. 17. doi: 10.3390/nu8010017
82. Kruk J., Kotarska K., Aboul-Enein B.H. Physical exercise and catecholamines response: benefits and health risk: possible mechanisms // *Free Radic Res.* – 2020. – V. 54, N 2-3. – P. 105-125. doi: 10.1080/10715762.2020.1726343
83. Kubow S., Hobson L., Iskandar M.M., Sabally K., Donnelly D.J., Agellon L.B. Extract of Irish potatoes (*Solanum tuberosum* L.) decreases body

weight gain and adiposity and improves glucose control in the mouse model of diet-induced obesity // *Mol Nutr Food Res.* – 2014. – V. 58, N 11. – P. 2235–2238. doi:10.1002/mnfr.201400013

84. Lee Y., Oh H., Lee M. Anti-inflammatory effects of Agar free-Gelidium amansii (GA) extracts in high-fat diet-induced obese mice // *Nutr. Res. Pract.* – 2018. – V. 12, N 6. – P. 479-485. doi: 10.4162/nrp.2018.12.6.479

85. Lewandowska U., Szewczyk K., Hrabec E., Janecka A., Gorlach S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols // *J Agric Food Chem.* – 2013. – V. 61, N 50. – P. 12183-12199. doi: 10.1021/jf404439b

86. Li J., Yang Y., Ning E., Peng Y., Zhang J. Mechanisms of poor oral bioavailability of flavonoid Morin in rats: From physicochemical to biopharmaceutical evaluations // *Eur J Pharm Sci.* – 2019. – V. 128. – P. 290-298. doi: 10.1016/j.ejps.2018.12.011

87. Lim Y.R.I., Preshaw P.M., Lim L.P., Ong M.M.A., Lin H.S., Tan K.S. Pterostilbene complexed with cyclodextrin exerts antimicrobial and anti-inflammatory effects // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, N 1. – P. 9072. doi: 10.1038/s41598-020-66031-8

88. Lin M., Han P., Li Y., Wang W., Lai D., Zhou L. Quinoa Secondary Metabolites and Their Biological Activities or Functions // *Molecules.* – 2019. – V. 24, N 13. – P. 2512. doi: 10.3390/molecules24132512

89. Liu C.H., Lin C.C., Hsu W.C., Chung C.Y., Lin C.C., Jassey A., Chang S.P., Tai C.J., Tai C.J., Shields J., Richardson C.D., Yen M.H., Tyrrell D.L.J., Lin L.T. Highly bioavailable silibinin nanoparticles inhibit HCV infection // *Gut.* – 2017. – V. 66, N 10. – P. 1853-1861. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312019

90. Liu Y., Liu J., Kong Z., Huan X., Li L., Zhang P., Wang Q., Guo Y., Zhu W., Qin P. Transcriptomics and metabolomics analyses of the mechanism of flavonoid synthesis in seeds of differently colored quinoa strains // *Genomics.* – 2022. – V. 114, N 1. – P. 138-148. doi: 10.1016/j.ygeno.2021.11.030

91. Logan I.E., Shulzhenko N., Sharpton T.J., Bobe G., Liu K., Nuss S., Jones M.L., Miranda C.L., Vasquez-Perez S., Pennington J.M., Leonard S.W.,

Choi J., Wu W., Gurung M., Kim J.P., Lowry M.B., Morgun A., Maier C.S., Stevens J.F., Gombart A.F. Xanthohumol Requires the Intestinal Microbiota to Improve Glucose Metabolism in Diet-Induced Obese Mice // *Mol Nutr Food Res.* – 2021. – N e2100389. – P. e2100389. doi: 10.1002/mnfr.202100389.

92. Luo G., Li Z., Wang Y., Wang H., Zhang Z., Chen W., Zhang Y., Xiao Y., Li C., Guo Y., Sheng P. Resveratrol Protects against Titanium Particle-Induced Aseptic Loosening Through Reduction of Oxidative Stress and Inactivation of NF- κ B // *Inflammation.* – 2016. – V. 39, N 2. – P. 775–785. doi:10.1007/s10753-016-0306-6

93. Maleki S.J., Crespo J.F., Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids // *Food Chem.* – 2019. – V. 299. – P. 125124. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124

94. Matvieieva N., Drobot K., Duplij V., Ratushniak Y., Shakhovsky A., Kyrpa-Nesmiian T., Mickevičius S., Brindza J. Flavonoid content and antioxidant activity of *Artemisia vulgaris* L. "hairy" roots // *Prep Biochem Biotechnol.* – 2019. – V. 49, N 1. – P. 82-87. doi: 10.1080/10826068.2018.1536994

95. McEwen B.S., Wingfield J.C. The concept of allostasis in biology and biomedicine // *Horm Behav.* – 2003. – V. 43, N 1. – P. 2-15. doi: 10.1016/s0018-506x(02)00024-7

96. Melini V., Melini F. Modelling and Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Black Quinoa by Response Surface Methodology // *Molecules.* – 2021. – V. 26, N 12. – P. 3616. doi: 10.3390/molecules26123616

97. Meng Y., Li C. Conformational changes and functional properties of whey protein isolate-polyphenol complexes formed by non-covalent interaction // *Food Chem.* – 2021. – V. 364. – P. 129622. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129622

98. Miller K., Feucht W., Schmid M. Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potential Health Effects Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview // *Nutrients.* – 2019. – V. 11, N 7. – P. 1510. doi: 10.3390/nu11071510

99. Miranda C.L., Elias V.D., Hay J.J., Choi J., Reed R.L., Stevens J.F. Xanthohumol improves dysfunctional glucose and lipid metabolism in diet-induced obese C57BL/6J mice // *Arch Biochem Biophys.* - 2016. – N 599. – P. 22-30. doi: 10.1016/j.abb.2016.03.008.
100. Mirhafez S.R., Azimi-Nezhad M., Dehabehe M., Hariri M., Naderan R.D., Movahedi A., Abdalla M., Sathyapalan T., Sahebkar A. The Effect of Curcumin Phytosome on the Treatment of Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial // *Adv Exp Med Biol.* – 2021. – V. 1308. – P. 25-35. doi: 10.1007/978-3-030-64872-5_3
101. Mollace V., Scicchitano M., Paone S., Casale F., Calandrucchio C., Gliozzi M., Musolino V., Carresi C., Maiuolo J., Nucera S., Riva A., Allegrini P., Ronchi M., Petrangolini G., Bombardelli E. Hypoglycemic and Hypolipemic Effects of a New Lecithin Formulation of Bergamot Polyphenolic Fraction: A Double Blind, Randomized, Placebo- Controlled Study // *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* – 2019. – V. 19, N 2. – P. 136-143. doi: 10.2174/1871530319666181203151513
102. Mourtzi N., Sertedaki A., Charmandari E. Glucocorticoid Signaling and Epigenetic Alterations in Stress-Related Disorders // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22, N 11. – P. 5964. doi: 10.3390/ijms22115964
103. Murota K., Nakamura Y., Uehara M. Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2018. – V. 82, N 4. – P. 600-610. doi: 10.1080/09168451.2018.1444467
104. Neamtu A.A., Szoke-Kovacs R., Mihok E., Georgescu C., Turcus V., Olah N.K., Frum A., Tita O., Neamtu C., Szoke-Kovacs Z., Cziaky Z., Mathe E. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extracts Comparative Analysis Regarding Their Phytonutrient Profiles, Antioxidant Capacity along with the In Vivo Rescue Effects Tested on a *Drosophila melanogaster* High-Sugar Diet Model // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – V. 9, N 11. – P. 1067. doi: 10.3390/antiox9111067

105. Negri A., Naponelli V., Rizzi F., Bettuzzi S. Molecular Targets of Epigallocatechin-Gallate (EGCG): A Special Focus on Signal Transduction and Cancer // *Nutrients*. – 2018. – V. 10, N 12. – P. 1936. doi: 10.3390/nu10121936
106. Noratto G.D., Murphy K., Chew B.P. Quinoa intake reduces plasma and liver cholesterol, lessens obesity-associated inflammation, and helps to prevent hepatic steatosis in obese db/db mouse // *Food Chem.* – 2019. – V. 287. – P. 107-114. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.061
107. Ohishi T., Goto S., Monira P., Isemura M., Nakamura Y. Anti-inflammatory Action of Green Tea // *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* – 2016. – V. 15, N 2. – P. 74-90. doi: 10.2174/1871523015666160915154443
108. Ong E.S., Pek C.J.N., Tan J.C.W., Leo C.H. Antioxidant and Cytoprotective Effect of Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) with Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – V. 9, N 11. – P. 1110. doi: 10.3390/antiox9111110
109. Panickar K.S. Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity // *Mol Nutr Food Res.* – 2013. – V. 57, N 1. – P. 34–47. doi:10.1002/mnfr.201200431
110. Panizzon G.P., Giacomini Bueno F., Ueda-Nakamura T., Nakamura C.V., Dias Filho B.P. Manufacturing Different Types of Solid Dispersions of BCS Class IV Polyphenol (Daidzein) by Spray Drying: Formulation and Bioavailability // *Pharmaceutics*. – 2019. – V. 11, N 10. – P. 492. doi: 10.3390/pharmaceutics11100492
111. Park S.H., Oh J., Jo M., et al. Water Extract of Lotus Leaf Alleviates Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy via Regulating Protein Metabolism-Related Pathways in Mice // *Molecules*. – 2020. – V. 25, N 20. – P. 4592. doi:10.3390/molecules25204592
112. Peng H.L., Huang W.C., Cheng S.C., Liou C.J. Fisetin inhibits the generation of inflammatory mediators in interleukin-1 β -induced human lung epithelial cells by suppressing the NF- κ B and ERK1/2 pathways // *Int*

Immunopharmacol. – 2018. – V. 60. – P. 202-210. doi: 10.1016/j.intimp.2018.05.004

113. Pereira E., Cadavez V., Barros L., Encina-Zelada C., Stojković D., Sokovic M., Calhelha R.C., Gonzales-Barron U., Ferreira I.C.F.R. Chenopodium quinoa Willd. (quinoa) grains: A good source of phenolic compounds // Food Res Int. – 2020. – V. 137. – P. 109574. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109574

114. Pereira S., Cline D.L., Glavas M.M., Covey S.D., Kieffer T.J.. Tissue-Specific Effects of Leptin on Glucose and Lipid Metabolism // Endocr Rev. – 2021. – V. 42, N 1. – P. 1-28. doi: 10.1210/endrev/bnaa027

115. Perez-Gregorio M.R., Simal-Gandara J. A Critical Review of the Characterization of Polyphenol-Protein Interactions and of Their Potential Use for Improving Food Quality // Curr Pharm Des. – 2017. – V. 23, N 19. – P. 2742-2753. doi: 10.2174/1381612823666170202112530

116. 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.

117. 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.

118. Petrov N.A., Sidorova Y.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 // Food and Raw Materials. – 2018. – V. 6, N 2. – P. 334-341. doi:10.21603/2308-4057-2018-2-334-341

119. Poole D.C., Copp S.W., Colburn T.D., Craig J.C., Allen D.L., Sturek M., O'Leary D.S., Zucker I.H., Musch T.I. Guidelines for animal exercise and training protocols for cardiovascular studies // Am. J. Physiol. Circ. Physiol. – 2020. – V. 318. – P. H1100–H1138.

120. Reeves P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet // *J Nutr.* – 1997. – V. 127, N 5 Suppl. – P. 838S-841S. doi: 10.1093/jn/127.5.838S
121. Ribnicky D.M., Roopchand D.E., Oren A., Grace M., Poulev A., Lila M.A., Havenaar R., Raskin I. Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1) // *Food Chem.* – 2014. – V. 142. – P. 349-357. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.073
122. Ribnicky D.M., Roopchand D.E., Poulev A., Kuhn P., Oren A., Cefalu W.T., Raskin I. Artemisia dracunculus L. polyphenols complexed to soy protein show enhanced bioavailability and hypoglycemic activity in C57BL/6 mice // *Nutrition.* – 2014. – V. 30, N 7-8 Suppl. – P. S4-10. doi: 10.1016/j.nut.2014.03.009
123. Riva A., Ronchi M., Petrangolini G., Bosisio S., Allegrini P. Improved Oral Absorption of Quercetin from Quercetin Phytosome®, a New Delivery System Based on Food Grade Lecithin // *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* – 2019. – V. 44, N 2. – P. 169-177. doi: 10.1007/s13318-018-0517-3
124. Roopchand D.E., Grace M.H., Kuhn P., et al. Efficient sorption of polyphenols to soybean flour enables natural fortification of foods // *Food Chem.* – 2012. – V. 131, N 4. – P. 1193-1200. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.103
125. Roopchand D.E., Kuhn P., Poulev A., et al. Biochemical analysis and in vivo hypoglycemic activity of a grape polyphenol-soybean flour complex // *J Agric Food Chem.* – 2012. – V. 60, N 36. – P. 8860-8865. doi: 10.1021/jf300232h
126. Roopchand D.E., Kuhn P., Rojo L.E., et al. Blueberry polyphenol enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice // *Pharmacol Res.* – 2013. – V. 68, N 1. – P. 59-67. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.008
127. Rosa A., Isola R., Pollastro F., Caria P., Appendino G., Nieddu M. The dietary flavonoid eupatilin attenuates in vitro lipid peroxidation and targets

lipid profile in cancer HeLa cells // *Food Funct.* – 2020. – V. 11, N 6. – P. 5179-5191. doi: 10.1039/d0fo00777c

128. Roy P., Dinda A.K., Chaudhury S., Dasgupta S. β -cyclodextrin encapsulated polyphenols as effective antioxidants // *Biopolymers.* – 2018. – V. 109, N 1. doi: 10.1002/bip.23084

129. Rubio-Ruiz M.E., Guarner-Lans V., Cano-Martínez A., Díaz-Díaz E., Manzano-Pech L., Gamas-Magaña A., Castrejón-Tellez V., Tapia-Cortina C., Pérez-Torres I. Resveratrol and Quercetin Administration Improves Antioxidant DEFENSES and reduces Fatty Liver in Metabolic Syndrome Rats // *Molecules.* – 2019. – V. 24, N 7. – P. 1297. doi:10.3390/molecules24071297

130. Sahin Z., Ozkurkculer A., Kalkan O.F., Bulmus F.G., Bulmus O., Kutlu S. Gonadotropin levels reduced in seven days immobilization stress-induced depressive-like behavior in female rats // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* – 2021. – V. 33, N 2. – P. 199-206. doi: 10.1515/jbcpp-2020-0195

131. 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. - T. 10. № 1. - C. 1527-1536.

132. Semaan D.G., Igoli J.O., Young L., Gray A.I., Rowan E.G., Marrero E. In vitro anti-diabetic effect of flavonoids and pheophytins from *Allophylus cominia* Sw. on the glucose uptake assays by HepG2, L6, 3T3-L1 and fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes // *J Ethnopharmacol.* – 2018. – V. 216. – P. 8-17. doi: 10.1016/j.jep.2018.01.014

133. Si X., Tian J., Shu C., Wang Y., Gong E., Zhang Y., Zhang W., Cui H., Li B. Serum Ceramide Reduction by Blueberry Anthocyanin-Rich Extract Alleviates Insulin Resistance in Hyperlipidemia Mice // *J Agric Food Chem.* – 2020. – V. 68, N 31. – P. 8185-8194. doi: 10.1021/acs.jafc.0c01931

134. Silva W., Torres-Gatica M.F., Oyarzun-Ampuero F., Silva-Weiss A., Robert P., Cofrades S., Giménez B. Double emulsions as potential fat replacers

with gallic acid and quercetin nanoemulsions in the aqueous phases // *Food Chem.* – 2018. – V. 253. – P. 71-78. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.128

135. Singh A.K., Raj V., Keshari A.K., Rai A., Kumar P., Rawat A., Maity B., Kumar D., Prakash A., De A., Samanta A., Bhattacharya B., Saha S. Isolated mangiferin and naringenin exert antidiabetic effect via PPARc/GLUT4 dual agonistic action with strong metabolic regulation // *Chemico-Biological Interactions.* – 2018. – V. 280. – P. 33–44. doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.007

136. Son H., Yang J.H., Kim H.J., Lee D.K. A Chronic Immobilization Stress Protocol for Inducing Depression-Like Behavior in Mice // *J Vis Exp.* – 2019. – V.147. doi: 10.3791/59546

137. Song C., Lv W., Li Y., Nie P., Lu J., Geng Y., Heng Z., Song L. Alleviating the effect of quinoa and the underlying mechanism on hepatic steatosis in high-fat diet-fed rats // *Nutr Metab (Lond).* – 2021. - V. 18, N 1. – P. 106. doi: 10.1186/s12986-021-00631-7

138. Song J., Qiu H., Du P., Mou F., Nie Z., Zheng Y., Wang M. Polyphenols extracted from Shanxi-aged vinegar exert hypolipidemic effects on OA-induced HepG2 cells via the PPAR α -LXR α -ABCA1 pathway // *J Food Biochem.* – 2022. – V. e14029. doi: 10.1111/jfbc.14029

139. Song Y., Huang L., Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling // *J Neuroimmunol.* – 2016. – V. 301. – P. 1-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.11.001

140. Spogli R., Bastianini M., Ragonese F., Iannitti R.G., Monarca L., Bastioli F., Nakashidze I., Brecchia G., Menchetti L., Codini M., Arcuri C., Mancinelli L., Fioretti B. Solid Dispersion of Resveratrol Supported on Magnesium DiHydroxide (Resv@MDH) Microparticles Improves Oral Bioavailability // *Nutrients.* – 2018. – V. 10, N 12. – P. 1925. doi: 10.3390/nu10121925

141. Ștefănescu B.E., Călinoiu L.F., Ranga F., Fetea F., Mocan A., Vodnar D.C., Crișan G. Chemical Composition and Biological Activities of the Nord-West Romanian Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium*

vitis-idaea L.) Leaves // *Antioxidants* (Basel). – 2020. – V. 9, N 6. – P. 495. doi: 10.3390/antiox9060495

142. Ștefănescu B.E., Szabo K., Mocan A., Crișan G. Phenolic Compounds from Five Ericaceae Species Leaves and Their Related Bioavailability and Health Benefits // *Molecules*. – 2019. – V. 24, N 11. – P. 2046. doi: 10.3390/molecules24112046

143. Strahler J., Rohleder N., Wolf J.M. Acute psychosocial stress induces differential short-term changes in catecholamine sensitivity of stimulated inflammatory cytokine production // *Brain Behav Immun*. – 2015. – V. 43. – P. 139-148. doi: 10.1016/j.bbi.2014.07.014

144. Surman M., Janik M.E. Stress and its molecular consequences in cancer progression // *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. – 2017. – V. 71, N 0. – P. 485-499. doi: 10.5604/01.3001.0010.3830

145. Szczurek A. Perspectives on Tannins // *Biomolecules*. – 2021. - V. 11, N 3. – P. 442. doi: 10.3390/biom11030442

146. Tang F., Xie Y., Cao H., Yang H., Chen X., Xiao J. Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: A polyphenol-protein interaction approach // *Food Chem*. – 2017. – V. 219. – P. 321-328. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.154

147. Tang Y., Tsao R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review // *Mol. Nutr. Food Res*. – 2017. – V. 61, N 7. – P. doi: 10.1002/mnfr.201600767

148. Thilakarathna S.H., Rupasinghe H.P.V. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement // *Nutrients*. - 2013. - N 5. - P. 3367-3387.

149. Tian Y., Liimatainen J., Alanne A.L., Lindstedt A., Liu P., Sinkkonen J., Kallio H., Yang B. Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants // *Food Chem*. – 2017. – V. 220. – P. 266-281. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.145

150. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols // *Nutrients*. – 2010. – V. 2, N 12. – P. 1231-1246. doi: 10.3390/nu2121231
151. Tuzcu Z., Orhan C., Sahin N., Juturu V., Sahin K. Cinnamon Polyphenol Extract Inhibits Hyperlipidemia and Inflammation by Modulation of Transcription Factors in High-Fat Diet-Fed Rats // *Oxid Med Cell Longev*. – 2017. – V. 2017. – P. 1583098. doi: 10.1155/2017/1583098
152. Veljković M., Pavlović D.R., Stojiljković N., Ilić S., Jovanović I., Poklar Ulrih N., Rakić V., Veličković L., Sokolović D. Bilberry: Chemical Profiling, in Vitro and in Vivo Antioxidant Activity and Nephroprotective Effect against Gentamicin Toxicity in Rats // *Phytother Res*. – 2017. – V. 31, N 1. – P. 115-123. doi: 10.1002/ptr.5738
153. Wang S.-H., Liu F.-F., Dong X.-Y., Sun Y. Thermodynamic Analysis of the Molecular Interactions between Amyloid β -Peptide 42 and (-)-Epigallocatechin-3-gallate // *J Phys Chem B*. – 2010. – V. 114, N 35. – P. 11576–11583. doi:10.1021/jp1001435.
154. Watson E.M. Some observations on the effect of blueberry leaf extract in diabetes mellitus // *Can Med Assoc J*. – 1928. – V. 19, N 2. – P. 166-171.
155. Witika B.A., Makoni P.A., Matafwali S.K., Mweetwa L.L., Shandele G.C., Walker R.B. Enhancement of Biological and Pharmacological Properties of an Encapsulated Polyphenol: Curcumin. *Molecules* // 2021. – V. 26, N 14. – P. 4244. doi: 10.3390/molecules26144244
156. Xia H.M., Wang J., Xie X.J., Xu L.J., Tang S.Q. Green tea polyphenols attenuate hepatic steatosis, and reduce insulin resistance and inflammation in high-fat diet-induced rats // *Int J Mol Med*. – 2019. – V. 44, N 4. – P. 1523-1530. doi: 10.3892/ijmm.2019.4285.
157. Xiong S., Liu W., Zhou Y., Mo Y., Liu Y., Chen X., Pan H., Yuan D., Wang Q., Chen T. Enhancement of oral bioavailability and anti-Parkinsonian efficacy of resveratrol through a nanocrystal formulation // *Asian J Pharm Sci*. – 2020. – V. 15, N 4. – P. 518-528. doi: 10.1016/j.ajps.2019.04.003

158. Xu J., Jönsson T., Plaza M., Håkansson Å., Antonsson M., Ahrén I.L., Turner C., Spégel P., Granfeldt Y. Probiotic fruit beverages with different polyphenol profiles attenuated early insulin response // *Nutr J.* – 2018. – V. 17, N 1. – P. 34. doi: 10.1186/s12937-018-0335-0
159. Yahfoufi N., Alsadi N., Jambi M., Matar C. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols // *Nutrients.* – 2018. – V. 10, N 11. – P. 1618. doi: 10.3390/nu10111618
160. Yoo S.R., Jeong S.J., Lee N.R., Shin H.K., Seo C.S. Quantification Analysis and In Vitro Anti-Inflammatory Effects of 20-Hydroxyecdysone, Momordin Ic, and Oleanolic Acid from the Fructus of *Kochia scoparia* // *Pharmacogn Mag.* – 2017. – V. 13, N 51. – P. 339-344. doi: 10.4103/0973-1296.211023
161. 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. – T. 640. – P. 022091.
162. Zhang A.M.Y., Wellberg E.A., Kopp J.L., Johnson J.D. Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer // *Diabetes Metab J.* – 2021. – V. 45, N 3. – P. 285-311. doi: 10.4093/dmj.2020.0250
163. Zhang Z.F., Li Q., Liang J., Dai X.Q., Ding Y., Wang J.B., Li Y. Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) protects the insulin sensitivity in rat L6 muscle cells exposed to dexamethasone condition // *Phytomedicine.* – 2010. – V. 17, N 1. – P. 14-18. doi:10.1016/j.phymed.2009.09.007
164. Zhong H., Abdullah, Deng L., Zhao M., Tang J., Liu T., Zhang H., Feng F. Probiotic-fermented blueberry juice prevents obesity and hyperglycemia in high fat diet-fed mice in association with modulating the gut microbiota // *Food Funct.* – 2020. – V. 11, N 10. – P. 9192-9207. doi: 10.1039/d0fo00334d

ПРИЛОЖЕНИЕ А

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ
ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»**

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН «ФИЦ Питания и
Биотехнологии»

_____ Никитюк Д.Б.

«__» _____ 2023 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ получения концентрата полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке

подготовлен в рамках выполнения диссертационной работы
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по теме:

**«Получение и оценка *in vivo* инновационных пищевых ингредиентов - биологически
активных соединений с биополимерными матрицами»**

СОДЕРЖАНИЕ

1. Характеристика конечной продукции	168
2. Химическая схема производства	170
3. Технологическая схема производства	170
4. Наименование и спецификация оборудования	171
5. Характеристика сырья и материалов	172
6. Описание технологического процесса	173
7. Переработка и обезвреживание отходов производства	174
8. Контроль производства	174
9. Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария	178
10. Охрана окружающей среды	178
11. Информационные материалы	179

Настоящий лабораторный регламент разработан в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002. Лабораторный регламент составлен для разработки и освоения технологии получения экспериментальных образцов концентрата полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке.

1. Характеристика конечной продукции

Концентрат полифенолов, экстрагированных из ягод черники, сорбированных на измельченной гречневой муке (концентрат), представляет собой функциональный пищевой ингредиент (ФПИ) гипогликемического и гиполипидемического действия, предназначенный для включения в состав специализированной пищевой продукции.

Внешний вид и консистенция: мелкодисперсный однородный порошок; допускается наличие легко рассыпающихся при механическом воздействии комочков. Цвет - свойственный используемому сырью. Вкус и запах - свойственные используемому сырью.

Физико-химические показатели концентрата приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля влаги, %, не более	4,4±0,4
Массовая доля белка, %	7,9±0,1
Массовая доля жира, %	3,8±0,1
Массовая доля углеводов, %	87,5±8,7
Содержание общих полифенолов, мг-экв. галловой кислоты/г	65,5±0,7
Суммарное содержание антоцианинов, мг/г	27,3±2,7

Маркировка потребительской тары, предназначенной для упаковывания концентрата, осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51074 и ГОСТ 24508.

На каждую единицу потребительской упаковки наносят маркировку, которая содержит следующую информацию:

- наименование концентрата;
- наименование и местонахождение предприятия-изготовителя (юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес производства);
- масса нетто (г);

- состав концентрата;
- пищевая ценность концентрата, в т.ч. содержание полифенольных соединений;
- дата изготовления;
- условия хранения;
- условия и продолжительность хранения после вскрытия потребительской упаковки (при фасовке массой нетто более 200 г);
- способ приготовления;
- рекомендации по применению;
- срок годности;
- обозначение документа, в соответствии с которым изготавливается концентрат.

Концентрат фасуют и упаковывают массой от 0,025 кг до 1,0 кг по ГОСТ 24508.

Концентрат упаковывают в следующие виды потребительской упаковки:

- пакеты по ГОСТ 24370 из пленки на основе комбинированных пленочных материалов с последующим упаковыванием в пачки из картона для потребительской тары по ГОСТ 12303;
- пакеты из комбинированных термосвариваемых полимерных материалов, в том числе на основе алюминиевой фольги типа 1-2, 1-5 по ГОСТ 12302;
- банки, закрываемые крышками вместимостью, от 500 см³ до 1000 см³ из пластмасс по ГОСТ Р 50962, укуренные фольгой алюминиевой по ГОСТ 745.

Допускается групповое упаковывание пакетов массой нетто от 0,025 кг в пачки из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933.

Допускается использование других видов тары и упаковочных материалов, разрешенных для упаковывания данного вида продукции.

Тара и материалы, используемые при упаковке, должны быть разрешены для контакта с данным видом продукции и соответствовать нормам ГН 2.3.3.972.

Концентрат должен храниться в чистых, сухих, не имеющих посторонних запахов складских помещениях при температуре не выше 25°C и относительной влажности воздуха не более 75%.

Срок годности концентрата при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения 12 месяцев с даты изготовления.

2. Химическая схема производства

В процессе производства концентрата химические превращения не происходят.

3. Технологическая схема производства концентрата



4. Наименование и спецификация оборудования

№ п/п	Наименование	Кол.	Материал рабочей зоны	Техническая характеристика
1.	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 (CASBEE, Корея)	1	Чашка из нержавеющей стали	Предназначены для выполнения операций взвешивания до 1200 г, дискретность 0,1 г, Воспроизводимость (СКО) на ПНВ 0,1 г, нелинейность 0,2 г, среднее время стабилизации 5 с, размер весовой чашки – d 150 мм, калибровка по аттестованным стандартам, класс точности 2-й по ГОСТ 24104-2001
2.	Весы прецизионные лабораторные MW 120 (CASBEE, Корея)	1	Чашка из нержавеющей стали	Предназначены для выполнения операций взвешивания до 1200 г, дискретность 0,01 г, Воспроизводимость (СКО) на ПНВ 0,01 г, нелинейность 0,02 г, среднее время стабилизации 5 с, размер весовой чашки – d 100 мм, калибровка по аттестованным стандартам, класс точности 2-й по ГОСТ 24104-2001
3	Ножевая мельница GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия)	1	Автоклавируемый пластик, нержавеющая сталь	Диапазон скоростей 2 000 - 10 000 об/мин, область применения: биология, медицина/фармацевтика, продукты питания, сельское хозяйство
5	Установка обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным «УРФ-1812»	1	Корпус – нержавеющая сталь	Производитель «Владисарт» РФ
6	Испаритель роторный ИР1М3	1	Нержавеющая сталь, стекло	Производитель «Химлаборприбор», Россия
7	Центрифуга препаративная напольная «BESKMAN J-6B», США	1	Полипропиленовые емкости для центрифугирования	Допускается использование полиэтиленовых емкостей аналогичного размера.
8	Стекло и пластиковые емкости и воронки	4	Стекло химическое молибденовое, пластик лабораторный	Изготовитель Россия.
9	Сушилка лиофильная лабораторная ЛС-500	1	Нержавеющая сталь, вакуумная резина.	Производитель «ПРОИНТЕХ» РФ
10	Дозаторы лабораторные автоматические переменного объема	1 комплект	В стандартном исполнении.	Допускается использование дозаторов, позволяющих обеспечивать точность дозирования водных растворов не ниже $\pm 2,0\%$

5. Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НДС	Показатели обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допускаемыми отклонениями
Ягоды черники	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Крупные однородные ягоды без нарушений внешних покровов
Гречневая мука	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Мелкодисперсный порошок коричневого цвета
Спирт этиловый ректификат	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Прозрачная жидкость с характерным запахом

6. Описание технологического процесса

1 Подготовка помещений, оборудования и персонала осуществляется в соответствии с СП 1408-76.

2 Прием и хранение сырья

Прием сырья осуществляется при наличии сопроводительной документации. Сырье хранят в герметичной таре на складе при температуре не более +20⁰С и относительной влажности воздуха не более 75 % или в соответствии с рекомендациями производителя.

3 Подготовка используемого сырья

Перед началом процесса гречневую муку измельчают с использованием ножевой мельницы GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия) при 8000 об/мин в течение 10 мин и просеивают через сито с диаметром пор 0,35 мм.

4 Проведение экстракции

4.1 Навеску сухих ягод перемешивают с 75% этиловым спиртом в соотношении 1 г ягод/20 мл экстрагента в специальной емкости, снабженной перемешивающим устройством, в течение 1 часа при температуре 25⁰С.

4.2 Смесь центрифугируют при 4000 об/мин в течение 30 мин и отбирают супернатант.

4.3 К осадку повторно добавляют 75% этиловый спирт в соотношении 1 г/10 мл, перемешивают в течение 1 часа, центрифугируют при 4000 об/мин в течение 30 мин.

4.4 Супернатанты, полученные на обеих стадиях выделения, объединяют и концентрируют на установке обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным.

4.5 Этанол из полученного экстракта удаляют на роторном испарителе.

5 Получение концентрата

5.1 Процесс сорбции полифенолов экстракта ягод на измельченной гречневой муке ведут в специальной емкости, снабженной перемешивающим устройством, при постоянном перемешивании смеси экстракта ягод и гречневой муки в соотношении 15мл/1г в течение 1 часа при температуре 25⁰С.

5.2 Полученную смесь центрифугируют при 4000 об/мин в течение 20 мин, супернатант отделяют от осадка декантированием, затем осадок лиофильно высушивают.

6 Фасовка, упаковка, маркировка

6.1 Полученный концентрат выгружают в емкость из нержавеющей стали и фасуют вручную массой от 0,025 кг до 1,0 кг в пакеты из комбинированных пленочных материалов или банки, закрывающиеся крышками. Предел допускаемых отрицательных

отклонений содержимого массы нетто упаковочной единицы продукции от номинального количества должен соответствовать требованиям ГОСТ 8.579-2002.

6.2 Маркировку наносят путем наклеивания этикетки.

7. Переработка и обезвреживание отходов производства

Этанол, удаленный из смеси на роторном испарителе, подвергается ректификации для последующего повторного использования в технологическом процессе.

8. Контроль производства

Программа контроля включает контроль процесса приготовления концентрата применительно к каждой технологической операции.

При входном контроле осуществляется проверка соответствия используемого сырья, вспомогательных и упаковочных материалов по показателям качества и безопасности документации изготовителя и требованиям соответствующих нормативных документов.

При контроле по ходу технологического процесса осуществляется проверка выполнения требований лабораторного регламента для обеспечения стабильности технологического процесса и качества готовой продукции.

Перечень важнейших контрольных точек производства концентрата

Наименование этапов технологического процесса, параметров (показателей)	Нормируемое значение параметра (показателя), допуски, отклонения	Правила отбора проб	Периодичность контроля	Методики выполнения измерений, средства измерений, их метрологические характеристики	
				технологического процесса	технохимического процесса
1	2	3	4	5	6
1. Подготовка сырья					
Измельчение (гречневая мука)	Наличие посторонних примесей – не допускается	Отбирается точечная проба массой не более 0,2 кг	Каждая партия	Сито из сетки проволочной тканой № 1.5. по ГОСТ 3826-82	
2. Проведение экстракции					
Взвешивание компонентов:	В соответствии с рецептурой		Каждая загрузка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200, класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
- ягоды черники лиофилизированные, г	1,0				
- спирт этиловый ректификат, мл	20,0				
Смешивание компонентов		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
- продолжительность смешивания, мин, не менее	60		Каждая загрузка	Блок управления смесителя	
Центрифугирование смеси		В соответствии с лабораторным			

		регламентом на производство концентрата			
- продолжительность центрифугирования, мин	30		Каждая загрузка	Блок управления центрифуги	
- скорость центрифугирования, об/мин	4000		Каждая загрузка	Блок управления центрифуги	
Концентрирование на установке обратного осмоса					
Удаление спирта на роторном испарителе					
3. Приготовление концентрата					
Взвешивание компонентом:	В соответствии с рецептурой		Каждая загрузка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 , класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
- гречневая мука, г	1,0				
- экстракт ягод черники, мл	15,0				
Смешивание компонентов		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
- время смешивания, мин	60		Каждая загрузка	Блок управления смесителя	
Центрифугирование смеси					
- продолжительность	20		Каждая загрузка	Блок управления	

центрифугирования, мин				центрифуги	
- скорость центрифугирования, об/мин	4000		Каждая загрузка	Блок управления центрифуги	
Лиофильное высушивание осадка		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
4. Фасовка, упаковка готовой продукции					
Взвешивание упаковочной единицы	В зависимости от выбранной упаковки по ГОСТ 15113.1-77	В зависимости от выбранной упаковки по ГОСТ 15113.1-77	Каждая упаковка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 , класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
6. Маркировка					
Качество маркировки	В соответствии с ГОСТ Р 51074-2003	В соответствии с ГОСТ Р 51074-2003	Каждая упаковка	Визуальный контроль	

9. Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария

Концентрат по степени воздействия на организм человека в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4-му классу опасности (малоопасные). При работе с ним следует соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.008-76 «Биологическая безопасность».

Концентрат является пожаро- и взрывобезопасным, не токсичным, не образует при внесении в почву вредных и токсичных соединений. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны производственных помещений должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005-88 «Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГН 2.2.5.686-98. Предельно-допустимая концентрация пыли растительного или животного происхождения в воздухе рабочей зоны производственных помещений должна составлять не более 6 мг/м³ воздуха. При производстве продукции не образуются отходы, требующие обеззараживания.

При проведении лабораторной выработки продукции, эксплуатации и обслуживании оборудования необходимо соблюдать следующие правила:

- лица, не ознакомленные с устройством оборудования, инструкциями по его эксплуатации, техникой безопасности к работе не допускаются;
- перед началом работы необходимо проверить состояние электропроводки и заземления;
- работа допускается только на исправном оборудовании, если в работе оборудования имеются неисправности, они должны быть немедленно устранены;
- строго запрещается включать оборудование влажными руками;
- все работы по загрузке и разгрузке рабочей камеры должны вестись только при выключенном смесителе и его полной остановке;
- загрузку и разгрузку смеси необходимо производить только с помощью специального совка.

10. Охрана окружающей среды

При производстве концентрата не утилизируемыми отходами являются газовоздушные выбросы из помещений, сточные воды, образующиеся в ходе технологического процесса. Утилизация твердых отходов происходит в общепринятом порядке. Аварийные ситуации, влекущие за собой загрязнение окружающей среды, в данном производстве отсутствуют.

Выделение загрязняющих веществ в воздух рабочей зоны при производстве концентрата возможно при измельчении и просеивании используемых ингредиентов, при загрузке компонентов и выгрузке готового продукта. Загрязненный воздух, содержащий производственную пыль, удаляется местным отсосом и проходит через фильтрационную установку, из которой удаляется общеобменной вентиляцией.

При производстве концентрата сточные воды образуются только при обработке и мойке оборудования, полов, стен и окон производственного помещения. Режим сброса сточных вод – периодический, количество их не превышает минимально допустимых количеств.

При производстве концентрата твердыми отходами являются легкие примеси, отсеvy, пыль от используемого сырья, бракованные пакеты, банки, крышки, отходы упаковочных материалов. Токсичные отходы в данном производстве отсутствуют.

11. Информационные материалы

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.018-86 ССБТ Пожарная безопасность. Электростатическая искробезопасность.

ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 12.1.044-89 ССБТ. Пожаровзрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения.

СП 1408-76 Санитарные правила для предприятий пищевого концентратной промышленности, М., 1976.

СанПиН 2.1.6.983-2000 Атмосферный воздух закрытых помещений, санитарная охрана воздуха.

СанПиН 2.1.6.1032-01 Гигиенические требования к обеспечению качества охраны атмосферного воздуха населенных мест.

СанПиН 2.1.7.1322-03 Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления.

СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

ГН 2.3.2.972-00 Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами.

ППБ-01-93 Правила пожарной безопасности в Российской Федерации.

СНиП 23-05-95 Естественное и искусственное освещение. Санитарные нормы и правила.

СНиП 21-01-97 Пожарная безопасность зданий и сооружений. Санитарные правила и нормы.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПИТАНИЯ, БИОТЕХНОЛОГИИ И
БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩИ
ФГБУН «ФИЦ ПИТАНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ»

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУН «ФИЦ Питания и
Биотехнологии»

_____ Никитюк Д.Б.

«__» _____ 2023 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

**получения концентрата флавоноидов и фитостероидов, экстрагированных из
зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца**

подготовлен в рамках выполнения диссертационной работы
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по теме:

**«Получение и оценка *in vivo* инновационных пищевых ингредиентов - биологически
активных соединений с биополимерными матрицами»**

Москва, 2023 год

СОДЕРЖАНИЕ

1. Характеристика конечной продукции	183
2. Химическая схема производства	185
3. Технологическая схема производства	185
4. Наименование и спецификация оборудования	186
5. Характеристика сырья и материалов	187
6. Описание технологического процесса	188
7. Переработка и обезвреживание отходов производства	189
8. Контроль производства	189
9. Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария	193
10. Охрана окружающей среды	193
11. Информационные материалы	194

Настоящий лабораторный регламент разработан в соответствии с ОСТ 64-02-003-2002. Лабораторный регламент составлен для разработки и освоения технологии получения экспериментальных образцов концентрата флавоноидов и фитоэкдистероидов, экстрагированных из зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца.

1. Характеристика конечной продукции

Концентрат флавоноидов и фитоэкдистероидов, экстрагированных из зерна черного киноа, сорбированных на коагулированном белке куриного яйца (концентрат), представляет собой функциональный пищевой ингредиент (ФПИ) адаптогенного действия, предназначенный для включения в состав специализированной пищевой продукции.

Внешний вид и консистенция: мелкодисперсный однородный порошок; допускается наличие легко рассыпающихся при механическом воздействии комочков. Цвет - свойственный используемому сырью. Вкус и запах - свойственные используемому сырью.

Физико-химические показатели концентрата приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1

Наименование показателя	Значение показателя
Массовая доля влаги, %, не более	5,0±0,5
Массовая доля белка, %	98,0±0,9
Содержание флавоноидов, мг/г зерна	0,27±0,03
Содержание фитоэкдистероидов, мг/г зерна	0,16±0,02

Маркировка потребительской тары, предназначенной для упаковывания концентрата, осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51074 и ГОСТ 24508.

На каждую единицу потребительской упаковки наносят маркировку, которая содержит следующую информацию:

- наименование концентрата;
- наименование и местонахождение предприятия-изготовителя (юридический адрес, включая страну, и, при несовпадении с юридическим адресом, адрес производства);
- масса нетто (г);

- состав концентрата;
- пищевая ценность концентрата, в т.ч. содержание флавоноидов и фитоэкдистероидов;
- дата изготовления;
- условия хранения;
- условия и продолжительность хранения после вскрытия потребительской упаковки (при фасовке массой нетто более 200 г);
- способ приготовления;
- рекомендации по применению;
- срок годности;
- обозначение документа, в соответствии с которым изготавливается концентрат.

Концентрат фасуют и упаковывают массой от 0,025 кг до 1,0 кг по ГОСТ 24508.

Концентрат упаковывают в следующие виды потребительской упаковки:

- пакеты по ГОСТ 24370 из пленки на основе комбинированных пленочных материалов с последующим упаковыванием в пачки из картона для потребительской тары по ГОСТ 12303;
- пакеты из комбинированных термосвариваемых полимерных материалов, в том числе на основе алюминиевой фольги типа 1-2, 1-5 по ГОСТ 12302;
- банки, закрываемые крышками вместимостью от 500 см³ до 1000 см³ из пластмасс по ГОСТ Р 50962, укуренные фольгой алюминиевой по ГОСТ 745.

Допускается групповое упаковывание пакетов массой нетто от 0,025 кг в пачки из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933.

Допускается использование других видов тары и упаковочных материалов, разрешенных для упаковывания данного вида продукции.

Тара и материалы, используемые при упаковке, должны быть разрешены для контакта с данным видом продукции и соответствовать нормам ГН 2.3.3.972.

Концентрат должен храниться в чистых, сухих, не имеющих посторонних запахов складских помещениях при температуре не выше 25°C и относительной влажности воздуха не более 75%.

Срок годности концентрата при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения - 15 суток с даты изготовления.

2. Химическая схема производства

В процессе производства концентрата химические превращения не происходят.

3. Технологическая схема производства концентрата



4. Наименование и спецификация оборудования

№ п/п	Наименование	Кол.	Материал рабочей зоны	Техническая характеристика
1.	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 (CASBEE, Корея)	1	Чашка из нержавеющей стали	Предназначены для выполнения операций взвешивания до 1200 г, дискретность 0,1 г, Воспроизводимость (СКО) на ПНВ 0,1 г, нелинейность 0,2 г, среднее время стабилизации 5 с, размер весовой чашки – d 150 мм, калибровка по аттестованным стандартам, класс точности 2-й по ГОСТ 24104-2001
2.	Весы прецизионные лабораторные MW 120 (CASBEE, Корея)	1	Чашка из нержавеющей стали	Предназначены для выполнения операций взвешивания до 1200 г, дискретность 0,01 г, Воспроизводимость (СКО) на ПНВ 0,01 г, нелинейность 0,02 г, среднее время стабилизации 5 с, размер весовой чашки – d 100 мм, калибровка по аттестованным стандартам, класс точности 2-й по ГОСТ 24104-2001
3	Ножевая мельница GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия)	1	Автоклавируемый пластик, нержавеющая сталь	Диапазон скоростей 2 000 - 10 000 об/мин, область применения: биология, медицина / фармацевтика, продукты питания, сельское хозяйство
4	Установка для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-018 («Владисарт», РФ)	1	Корпус - нержавеющая сталь. Ультрафильтрационная мембрана на полиамидной основе	Допускает использование мембран при давлении до 4 атмосфер.
5	Установка обратного осмоса с фильтром рулонным мембранным «УРФ-1812»	1	Корпус – нержавеющая сталь.	Производитель «Владисарт» РФ
6	Испаритель роторный ИР1М3	1	Нержавеющая сталь, стекло	Производитель «Химлаборприбор», Россия
7	Центрифуга препаративная напольная «BESKMAN J-6B», США	1	Полипропиленовые емкости для центрифугирования	Допускается использование полиэтиленовых емкостей аналогичного размера.
8	Стеклянные и пластиковые емкости и воронки	4	Стекло химическое молибденовое, пластик лабораторный	Изготовитель Россия.
9	Сушилка лиофильная лабораторная ЛС-500	1	Нержавеющая сталь, вакуумная резина.	Производитель «ПРОИНТЕХ» РФ
10	Дозаторы лабораторные автоматические переменного объема	1 комплект	В стандартном исполнении.	Допускается использование дозаторов, позволяющих обеспечивать точность дозирования водных растворов не ниже $\pm 2,0\%$

5. Характеристика сырья и материалов

Наименование	Обозначение НД	Показатели обязательные для проверки	Регламентируемые показатели с допускаемыми отклонениями
Зерно черного киноа	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Однородное зерно темно-серого или черного цвета
Коагулированный белок куриного яйца	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Мелкодисперсный порошок белого цвета
Спирт этиловый ректификат	Сертификат поставщика	Гигиенический сертификат	Прозрачная жидкость с характерным запахом

6. Описание технологического процесса

1 Подготовка помещений, оборудования и персонала осуществляется в соответствии с СП 1408-76.

2 Прием и хранение сырья

Прием сырья осуществляется при наличии сопроводительной документации. Сырье хранят в герметичной таре на складе при температуре не более +20⁰С и относительной влажности воздуха не более 75 % или в соответствии с рекомендациями производителя.

3 Подготовка используемого сырья

Перед началом процесса зерно черного киноа измельчают с использованием ножевой мельницы GRINDOMIX GM200 (Retsch, Германия) при 8000 об/мин в течение 10 мин и просеивают через сито с диаметром пор 0,35 мм.

4 Проведение экстракции

4.1 Экстракцию фитостероидов, представленных мажорным экистероидом 20-гидроксиэкидином (20E), и флавоноидов из размолотого и просеянного зерна ведут в специальной емкости, снабженной перемешивающим устройством, при температуре 25⁰С в течение 1 часа, перемешивая 200 г размолотого и просеянного зерна с 4000 мл 40% раствора этанола.

4.2 Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин и отбирают супернатант.

4.3 Проводят ультрафильтрацию супернатанта через мембрану с диаметром пор 10 кДа на установке для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-018 (Владисарт, РФ).

4.5 Полученный ультрафильтрат концентрируют на установке для обратного осмоса (Владисарт, РФ).

4.6 Этанол из полученного экстракта удаляют на роторном испарителе.

5 Получение концентрата

Получение концентрата ведут при постоянном перемешивании экстракта зерна черного киноа с коагулированным белком куриного яйца в специальной емкости, снабженной перемешивающим устройством, при температуре 25⁰С в течение 1 часа в соотношении 1г белка/45мл экстракта с последующим лиофильным высушиванием.

6 Фасовка, упаковка, маркировка

6.1 Полученный концентрат выгружают в емкость из нержавеющей стали и фасуют вручную массой от 0,025 кг до 1,0 кг в пакеты из комбинированных пленочных

материалов или банки, закрывающиеся крышками. Предел допускаемых отрицательных отклонений содержимого массы нетто упаковочной единицы продукции от номинального количества должен соответствовать требованиям ГОСТ 8.579-2002.

6.2 Маркировку наносят путем наклеивания этикетки.

7. Переработка и обезвреживание отходов производства

Этанол, удаленный из смеси на роторном испарителе, подвергается ректификации для последующего повторного использования в технологическом процессе.

8. Контроль производства

Программа контроля включает контроль процесса приготовления концентрата применительно к каждой технологической операции.

При входном контроле осуществляется проверка соответствия используемого сырья, вспомогательных и упаковочных материалов по показателям качества и безопасности документации изготовителя и требованиям соответствующих нормативных документов.

При контроле по ходу технологического процесса осуществляется проверка выполнения требований лабораторного регламента для обеспечения стабильности технологического процесса и качества готовой продукции.

Перечень важнейших контрольных точек производства концентрата

Наименование этапов технологического процесса, параметров (показателей)	Нормируемое значение параметра (показателя), допуски, отклонения	Правила отбора проб	Периодичность контроля	Методики выполнения измерений, средства измерений, их метрологические характеристики	
				технологического процесса	технохимического процесса
1	2	3	4	5	6
1. Подготовка сырья					
Измельчение, просеивание (зерно черного киноа)	Наличие посторонних примесей – не допускается	Отбирается точечная проба массой не более 0,2 кг	Каждая партия	Сито из сетки проволочной тканой № 1.5. по ГОСТ 3826-82	
2. Проведение экстракции					
Взвешивание компонентов:	В соответствии с рецептурой		Каждая загрузка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 , класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
- измельченное зерно черного киноа, г	200,0				
- спирт этиловый ректификат, мл	4000,0				
Смешивание компонентов		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
- продолжительность смешивания, мин, не менее	60		Каждая загрузка	Блок управления смесителя	

Центрифугирование смеси		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
- продолжительность центрифугирования, мин	30		Каждая загрузка	Блок управления центрифуги	
- скорость центрифугирования, об/мин	3000		Каждая загрузка	Блок управления центрифуги	
Ультрафильтрация супернатанта		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
Концентрирование на установке обратного осмоса					
Удаление спирта на роторном испарителе					
3. Приготовление концентрата					
Взвешивание компонентов:	В соответствии с рецептурой		Каждая загрузка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 , класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
- коагулированный белок куриного яйца, г	1,0				
- экстракт зерна черного киноа, мл	45,0				

Смешивание компонентов		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
- время смешивания, мин	60		Каждая загрузка	Блок управления смесителя	
Лиофильное высушивание		В соответствии с лабораторным регламентом на производство концентрата			
4. Фасовка, упаковка готовой продукции					
Взвешивание упаковочной единицы	В зависимости от выбранной упаковки по ГОСТ 15113.1-77	В зависимости от выбранной упаковки по ГОСТ 15113.1-77	Каждая упаковка	Весы прецизионные лабораторные MW 1200 , класс точности 2-й, дискретность 0,1г	
6. Маркировка					
Качество маркировки	В соответствии с ГОСТ Р 51074-2003	В соответствии с ГОСТ Р 51074-2003	Каждая упаковка	Визуальный контроль	

9. Техника безопасности, пожарная безопасность, производственная санитария

Концентрат по степени воздействия на организм человека в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4-му классу опасности (малоопасные). При работе с ними следует соблюдать требования безопасности по ГОСТ 12.1.008-76 «Биологическая безопасность».

Концентрат является пожаро- и взрывобезопасным, не токсичным, не образует при внесении в почву вредных и токсичных соединений. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны производственных помещений должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005-88 «Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования» и ГН 2.2.5.686-98. Предельно-допустимая концентрация пыли растительного или животного происхождения в воздухе рабочей зоны производственных помещений должна составлять не более 6 мг/м³ воздуха. При производстве продукции не образуются отходы, требующие обеззараживания.

При проведении лабораторной выработки продукции, эксплуатации и обслуживании оборудования необходимо соблюдать следующие правила:

- лица, не ознакомленные с устройством оборудования, инструкциями по его эксплуатации, техникой безопасности к работе не допускаются;
- перед началом работы необходимо проверить состояние электропроводки и заземления;
- работа допускается только на исправном оборудовании, если в работе оборудования имеются неисправности, они должны быть немедленно устранены;
- строго запрещается включать оборудование влажными руками;
- все работы по загрузке и разгрузке рабочей камеры должны вестись только при выключенном смесителе и его полной остановке;
- загрузку и разгрузку смеси необходимо производить только с помощью специального совка.

10. Охрана окружающей среды

При производстве концентрата не утилизируемыми отходами являются газовоздушные выбросы из помещений, сточные воды, образующиеся в ходе технологического процесса. Утилизация твердых отходов происходит в общепринятом порядке. Аварийные ситуации, влекущие за собой загрязнение окружающей среды, в данном производстве отсутствуют.

Выделение загрязняющих веществ в воздух рабочей зоны при производстве концентрата возможно при измельчении и просеивании используемых ингредиентов, при загрузке компонентов и выгрузке готового продукта. Загрязненный воздух, содержащий производственную пыль, удаляется местным отсосом и проходит через фильтрационную установку, из которой удаляется общеобменной вентиляцией.

При производстве концентрата сточные воды образуются только при обработке и мойке оборудования, полов, стен и окон производственного помещения. Режим сброса сточных вод – периодический, количество их не превышает минимально допустимых количеств.

При производстве концентрата твердыми отходами являются легкие примеси, отсева, пыль от используемого сырья, бракованные пакеты, банки, крышки, отходы упаковочных материалов. Токсичные отходы в данном производстве отсутствуют.

11. Информационные материалы

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования.

ГОСТ 12.1.005-88 ССБТ Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

ГОСТ 12.1.018-86 ССБТ Пожарная безопасность. Электростатическая искробезопасность.

ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты.

ГОСТ 12.1.044-89 ССБТ. Пожаровзрывоопасность веществ и материалов. Номенклатура показателей и методы их определения.

СП 1408-76 Санитарные правила для предприятий пищевого концентратной промышленности, М., 1976.

СанПиН 2.1.6.983-2000 Атмосферный воздух закрытых помещений, санитарная охрана воздуха.

СанПиН 2.1.6.1032-01 Гигиенические требования к обеспечению качества охраны атмосферного воздуха населенных мест.

СанПиН 2.1.7.1322-03 Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления.

СанПиН 2.2.4.548-96 Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.

ГН 2.3.2.972-00 Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами.

ППБ-01-93 Правила пожарной безопасности в Российской Федерации.

СНиП 23-05-95 Естественное и искусственное освещение. Санитарные нормы и правила.

СНиП 21-01-97 Пожарная безопасность зданий и сооружений. Санитарные правила и нормы.