

На правах рукописи

ФЕДУЛОВА ЛИЛИЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОБОСНОВАННОСТЬ И ПРАКТИЧЕСКАЯ  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ПОДХОДА К ИССЛЕДОВАНИЯМ  
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Специальность 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и  
холодильных производств

Специальность 05.18.07 – биотехнология пищевых продуктов и биологически  
активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора технических наук

Москва–2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук

**Научный консультант:** Доктор технических наук, профессор, академик РАН **Чернуха Ирина Михайловна**

**Официальные оппоненты:** **Кочеткова Алла Алексеевна** – доктор технических наук, профессор, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», лаборатория пищевых биотехнологий и специализированных продуктов, заведующая лабораторией

**Абрамова Любовь Сергеевна** – доктор технических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»), Департамент мониторинга среды обитания, водных биоресурсов и продуктов их переработки, советник

**Глотова Ирина Анатольевна** – доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет им. Императора Петра I», кафедра «Технологии переработки животноводческой продукции», заведующая кафедрой

**Ведущая организация:** Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)»

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_» июня 2021 г. в \_\_\_\_\_ на заседании ученого совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН по адресу: г. Москва, ул. Талалихина, 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН и на сайте [www.vniimp.ru](http://www.vniimp.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
кандидат технических наук,  
старший научный сотрудник

Захаров А.Н.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность темы.** Питание, как составляющая образа жизни, представляется важнейшим фактором, определяющим здоровье человека, в том числе связанным с поддержанием резистентности и высокой работоспособности, сохранением генофонда нации. Многочисленными клиническими исследованиями показано, что питание играет огромную роль как в снижении риска развития различных заболеваний, так и в возникновении 80 % всех патологических состояний, значительную часть которых составляют социально-значимые заболевания, охватывающие большие группы населения всех стран (Farhadi S., Ovchinnikov R., 2018). Алиментарные факторы существенно влияют на развитие сердечно-сосудистых заболеваний – в 61 % случаях; онкопатологии – в 30 %; сахарного диабета II типа – 6 %, остеопороза и алиментарных дефицитов – 4 %, эндокринных патологий, заболеваний желудочно-кишечного тракта, печени и пр. (Weininger J., 2019).

Среди основных антиалиментарных факторов выделяют высокую калорийность пищевой продукции, избыточное потребление насыщенных жирных кислот, углеводов и поваренной соли, дефицита или избытка микронутриентов (Чернуха И.М., 2019). Данные факторы могут оказывать краткосрочные или отдаленные последствия, влияя не только на популяционные показатели населения, но и вызывая реакции на любой стадии жизни индивидуума (Качковский М.А., 2014). Применение новейших методов геномики, протеомики и метаболомики совместно с изучением эпидемиологической распространенности заболеваний, позволили выявить корреляционную связь между генотипом человека, обусловливающим индивидуальную реакцию на различные нутрицевтики, и нутриентами, которые воздействуют не только на организменном, тканевом, клеточном, но и молекулярном уровне – на экспрессию гена (Waterland R.A., 2007; Вайсерман А.М., 2011; Tammen S.A., 2013; Лукоянова О.Л., 2015; Tiffon C., 2018).

Для предотвращения социально-значимых заболеваний широко используют модификации характера питания в подверженных риску популяциях, за счет введения в рацион обогащенных и специализированных продуктов питания, включающих различные пищевые факторы – физиологически активные вещества, полученные разнообразными биотехнологическими путями. В связи с этим особую актуальность приобретают новые стратегии исследования и разработка комплексного подхода к изучению биобезопасности, биологических свойств и эффективности пищевых продуктов, в том числе биологически активных веществ, на моделях *in vitro* и *in vivo*.

**Степень разработанности темы.** Научными и прикладными исследованиями в области создания технологий специализированных и функциональных продуктов, содержащих БАВ различной природы, а также разработкой методов анализа их свойств и характеристик занимались такие ученые, как А.А. Покровский, К.С.

Петровский, Н.Н. Липатов, В.М. Позняковский, В.А. Тутельян, И.А. Рогов, А.Б. Лисицын, Д. Б. Никитюк, А.В. Устинова, И.М. Чернуха, А.А. Кочеткова, И.Ф. Горлов.

Отдельные этапы работы выполнены в рамках:

- государственного задания ФГБНУ «ВНИИМП им. В.М. Горбатова», темы № 013.04 «Изучить возможности внедрения методов моделирования патологических состояний у лабораторных животных с целью изучения и прогнозирования воздействия на организм человека пищевых ингредиентов, добавок и продуктов питания с заявленными корригирующими свойствами» (2010 – 2013 гг.), № 013.02. «Выделить и изучить биологически активные вещества, полученные из малоценного сырья животного происхождения, обладающие корригирующим действием при различных патологических состояниях человека, с целью создания на их основе природных лечебно-профилактических средств» (2013 – 2015 гг.); № 013.01 «Разработать научные основы применения альтернативных методов биомоделирования для изучения корригирующих свойств функциональных ингредиентов, добавок и продуктов питания с заявленными корригирующими свойствами» (2015 – 2017 гг.); № 013.02 «Изучить молекулярно-биологические основы механизмов действия биологически активных веществ животного происхождения *in vivo* с оценкой их тканевой специфичности» (2015 – 2018 гг.); № 013.05 «Разработать научно-практические основы технологий функциональных модулей, содержащих БАВ животного и растительного происхождения и методы *in vitro* для изучения биоконверсии модулей белковой природы сырья и пищевых продуктов животного и растительного происхождения» (2020 – 2022 гг.);
- федеральной целевой программы № 14.512.11.0038 «Разработка комплекса биотехнологических методов контроля качества пищевых продуктов, в том числе включающих использование протеомных технологий с апробацией их на вновь созданных функциональных мясных продуктах» (2013 г.);
- грантов Российского научного фонда: № 15-16-00008 «Разработка инновационных природных стимуляторов неспецифического иммунитета адаптогенного действия на основе видо- и тканеспецифичных биомолекул» (2015 – 2019 гг.); № 16-16-10073 «Изучение механизмов биосинтеза и деградации специфических биологически активных белков и пептидов под действием ферментативного и неферментативного протеолиза тканей *Sus scrofa* и *Bos taurus* и разработка на их основе специализированных пищевых продуктов» (2016 – 2020 гг.); № 19-76-10034 «Направленная *in vivo* модификация протеостаза продуктивных животных для создания инновационной технологии дието-терапевтического мясного продукта» (2019 – 2021 г.).

### **Цель и задачи исследования.**

Целью работы являлось научное обоснование, разработка и практическая реализация процедуры комплексного постадийного исследования на моделях *in*

*vitro*, *ex vivo* и *in vivo* эффективности и биобезопасности пищевых продуктов функционального и специализированного действия с аprobацией на примере технологий обогащения их биоактивными веществами природного происхождения.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Научно обосновать стратегии разработки эффективных биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов, включая подходы к извлечению, сохранению и таргетной доставки целевых соединений.

2. Провести сравнительный анализ современных методов оценки качества, безопасности и свойств функциональных пищевых продуктов и ингредиентов, а также специализированных продуктов питания на основе биоактивных веществ природного происхождения.

3. Адаптировать и экспериментально обосновать эффективность методики *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для изучения специфической активности и молекулярно-биологических механизмов действия биологически активных соединений, специализированных и функциональных пищевых продуктов.

4. Разработать алгоритм и общие принципы выбора оптимальной процедуры исследования специфического действия биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе.

5. На основе современных биотехнологических знаний оптимизировать пути повышения эффективности функциональных и специализированных пищевых продуктов.

6. Разработать частную технологию специализированного пищевого продукта, обогащённого биоактивными веществами, со специфической активностью и аprobировать предложенную научную концепцию.

7. Разработать технологию микрокапсулирования биоактивных соединений белковой природы в биосовместимые носители. Оценить управляемость доставки и высвобождения их в желудочно-кишечном тракте; подтвердить сохранность активности целевых компонентов.

8. Провести опытно-промышленную аprobацию технологий и методов подтверждения специфической активности пищевых продуктов и оценить их результативность.

### **Научная новизна исследования.**

Сформулирована стратегия, теоретически обоснован порядок выбора и комплексное постадийное изучение функциональных и специфических свойств продуктов, в равной степени эффективных при исследовании пищевых добавок, полупродуктов и продуктов, основанных на отборе, адаптации и аprobации на примере частных технологий методов подтверждения биологических свойств (в т.ч. антиоксидантных, иммуномодулирующих, цитопротективных,

гиполипидемических, гипогликемических, нейропротективных и т.д.) анализируемого объекта.

С учетом мультидисциплинарных подходов сформулированы общие требования к оценке функциональных и специализированных продуктов питания, разработан алгоритм выбора биотест-систем и моделей. Установлено, что сформулированная стратегия комплексной оценки биологических специфических свойств позволяет: применить ее к изучению функциональных, диетотерапевтических и дието-профилактических продуктов питания; адаптировать и успешно использовать методики *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для изучения биологических свойств и молекулярно-биологических механизмов действия биоактивных веществ; расширить возможности исследований путем применения современных физико-химических, в том числе протеомных методов, тест-систем *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*; сократить время выбора оптимального набора моделей и биотест-систем для получения достоверных и воспроизводимых результатов.

Научно обоснованы биотехнологические приемы и подтверждена эффективность продуктов за счет сокращения потерь биоактивных соединений белковой природы животного происхождения благодаря их включению в биосовместимые носители. Выявлены закономерности и характер высвобождения целевых веществ в условиях желудочно-кишечного тракта объекта, что позволяет управлять процессом таргетной доставки и продолжительность воздействия биоактивного белково-пептидного комплекса.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Разработан алгоритм комплексной оценки биоактивных веществ животного и растительного происхождения, функциональных и специализированных пищевых (на примере мясных) продуктов и ингредиентов.

На основе проведенных исследований разработаны и утверждены методические рекомендации по экспериментальному моделированию сердечно-сосудистых заболеваний у лабораторных животных (Федулова Л.В., Котенкова Е.А., Арашанова Э.Б., 2018), программа и методики оценки эффективности биологически активных веществ животного происхождения и мясных специализированных продуктов (Федулова Л.В., Котенкова Е.А., Василевская Е.Р., Кашинова Э.Б., Ахремко А.Г., 2020), которые используются на практике в Экспериментальной клинике-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН при оценке пищевых продуктов и добавок.

Сформулированные требования к специализированным продуктам и методам их оценки включены в ГОСТ Р 1.7.036-1.006.16 «Продукция пищевая специализированная. Консервы мясные стерилизованные фаршевые биокорректирующего действия. Технические условия», учтены при разработке лабораторного регламента на производство Функционального мясного

продукта/2018 и прошли апробацию на АО «Йошкар-Олинский мясокомбинат». Технология микрокапсулирования прошла технологическую апробацию на ОАО «Московский завод сычужного фермента» (2018). Практическая новизна разработок подтверждена патентами РФ № 2524127 и № 2550649. Полученные результаты могут быть использованы при разработке специализированных и функциональных продуктов питания, в том числе биоактивных добавок к пище, при проведении доклинических исследований с целью прогнозирования и изучения эффективности их применения для диетопрофилактики и диетотерапии социально-значимых заболеваний.

Научные положения и материалы исследований используются в составе лекционных материалов и практических занятий при обучении на базовой кафедре «Технологии мясных продуктов» Мега-факультета технологий пищевых продуктов и технологического менеджмента ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления им. К. Г. Разумовского (ПКУ)», в дипломных работах бакалавров и магистров ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», ФГБОУ ВО «МГАВМиБ им. К.И. Скрябина», «РГАУ – МСХА им. К. А. Тимирязева», Аграрно-технологический Институт РУДН, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского».

**Методология и методы исследований** построены на последовательном выполнении следующих этапов: формулирование проблемы, темы и цели работы, анализ научно-технической и патентной информации по теме исследований, формулирование рабочей гипотезы и определение задач исследований, разработка научной концепции реализации рабочей гипотезы, проведение исследований с применением общепринятых стандартизованных и оригинальных методов оценки качества сырья, полуфабрикатов и продуктов, математическая обработка экспериментальных данных и результатов, оценка возможных научных и практических стратегий, апробация предложенных решений на разработанных частных технологиях продуктов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- Концептуальные основы и доминирующие факторы оценки специализированных и функциональных пищевых продуктов на основе биоактивных веществ животного происхождения.
- Теоретические и экспериментальные обоснования методологии оценки специфической активности и молекулярно-биологических механизмов действия биологически активных ингредиентов, специализированных и функциональных продуктов питания.
- Алгоритм выбора схемы проведения исследований и использования методов *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* для изучения биоактивных компонентов и

биокорригирующих эффектов на организм специализированных и функциональных продуктов питания.

- Научное обоснование повышения эффективности специализированного продукта за счет обогащения биоактивными белково-пептидными комплексами и сокращения времени таргетной доставки.

**Достоверность полученных результатов** подтверждается корректным использованием теоретических и экспериментальных средств и методик проведения исследований, обоснованием и статистической обработкой результатов.

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно и является совокупностью многолетних научных исследований. Автором лично сформулирована проблема, определены цель и задачи исследований и пути их реализации. Проведены теоретические и экспериментальные обоснования эффективности применения методов и тест-систем для оценки свойств специализированных и функциональных пищевых продуктов. Материалы диссертации проанализированы и обобщены лично автором. Вклад в работу других авторов отражен в публикациях по теме диссертации.

**Апробация работы.** Результаты исследования доложены на: XV Всероссийском конгрессе диетологов и нутрициологов с международным участием «Здоровое питание: от фундаментальных исследований к инновационным технологиям», XVI Российской агропромышленной выставки «Золотая осень» (Москва, 2014); XIII международной специализированной выставки «Мир биотехнологии 2015» секция «Биотехнология пищи. Продукты здорового питания» (Москва, 2015); V ежегодной научно-практической конференции специалистов по работе с лабораторными животными «Лабораторные животные: наука, фармакология, ветеринария (Белгород, 2015); International 58th Meat industry conference «Meat safety and Quality Where it goes?» (MeatCon 2015) (Сербия, 2015); 5th European Immunology & Innate Immunity (Берлин, 2016); Konferenci «Hygiena a technologie potravin XLVI. Lenfeldovy a Höklový dny» (Брно, 2016); 62nd International Congress of Meat Science and Technology (Бангкок, 2016); Международной конференции «Новые подходы к разработке технологий производства и переработке сельскохозяйственной продукции» (Волгоград, 2018); XXVII международной научной конференции «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (NT + M&Ec) (Крым, 2019); «Современные достижения и проблемы генетики и биотехнологии в животноводстве», посвященной 90-летию академика Л.К. Эрнста и 90-летию Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста (Подольск, 2019); 3-ей Международной научно-практической конференции «Функциональные продукты питания: научные

основы разработки, производства и потребления» (Москва, 2019); IV Международной конференции «Функциональные продукты питания: научные основы разработки, производства и потребления» (Москва, 2020); XXII Международной научно-практической конференции, посвященной памяти Василия Матвеевича Горбатова «Пищевые системы. Биобезопасность, технологии и инжиниринг» (Москва, 2020).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 108 печатных работ, из них 2 монографии, 23 публикации в изданиях, индексируемых международными базами данных WOS и Scopus (7 из которых в Q1-2), 40 публикаций в ведущих рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также 2 патента на изобретение, 1 Методические рекомендации и 1 Программа и методики.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы из 445 наименований и 11 приложений. Основное содержание работы изложено на 323 страницах, включает 62 таблицы и 70 рисунков.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

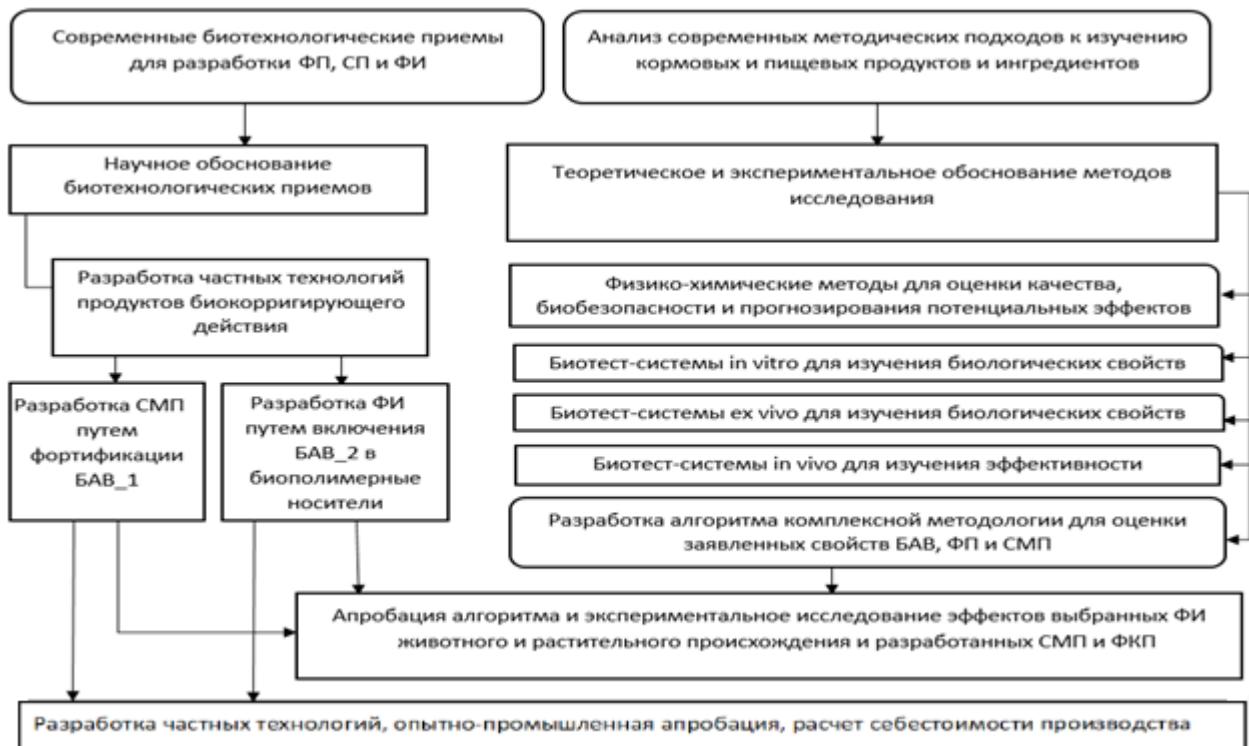
**ВВЕДЕНИЕ.** Изложена актуальность работы на текущий момент развития науки и практики в исследуемой области, отмечено, что при глобальном увеличении рынка функциональных и специализированных продуктов питания, достаточном количестве методов контроля показателей их качества и безопасности ощущается дефицит методов оценки их эффективности.

**ГЛАВА 1. Молекулярно-биологические основы создания специализированных продуктов питания на основе природных биоактивных веществ.** Представлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по теме исследования. Проанализированы данные о роли алиментарных факторов риска в развитии социально-значимых заболеваний, рассмотрены пути их коррекции с помощью функциональных и специализированных пищевых продуктов.

**ГЛАВА 2. Обоснование направлений исследований, их цель и задачи.** Обоснованы перспективы создания передовых методов контроля качества и безопасности введенных или присутствующих в продукте биоактивных веществ и изучения их биокорригирующих свойств. Определены направления исследования, сформулирована цель и научные задачи для ее достижения.

**ГЛАВА 3. Организация и методология исследований: схема эксперимента, объекты и методы, аппаратурное оснащение.** Изложена методология выполнения работы и ее организация, включая последовательную реализацию всех ее этапов. Все теоретические и экспериментальные исследования проведены

в соответствии с поставленными задачами в Экспериментальной клинико-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения, Испытательном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (ИНБИ РАН), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» (ИБМХ). Общая структура работы представлена на рис. 1.



**Рисунок 1 – Организационно иерархическая структура диссертационной работы**

Объектами исследований на различных этапах работы являлись:

- специализированные мясные продукты – консервы мясные стерилизованные фаршевые биокорректирующего действия: **СМП\_1** – продукт из свиных сердец и аорт (Котенкова Е.А., 2015) для снижения риска развития и последствий гиперлипидемии и атеросклероза; **СМП\_2** – продукт из прижизненно-модифицированной свинины (Федулова Л.В., 2011) для снижения риска развития и последствий цереброваскулярной патологии; **СМП\_2Ф** – СМП\_2, обогащенный БАВ\_1, для диетотерапии патологий центральной и периферической нервной системы;
- функциональные ингредиенты животного происхождения: **БАВ\_1** – белковый гидролизат НСР-Р-150 (Proliver, Бельгия), полученный при гидролизе белка сельскохозяйственной птицы (кур); **БАВ\_2** – белково-пептидный комплекс иммунных органов свиней (Василевская Е.Р., 2019), полученный водно-солевой экстракцией на основе воды с модифицированным изотопным составом;

**функциональный капсулированный ингредиент – БАВ\_2, включенный в кальций-альгинатные капсулы;**

- функциональные ингредиенты растительного происхождения: ягоды годжи высушенные: **LB** – *Lycium barbarum*, полученные из Академии сельскохозяйственных наук Чжэньцзян (Китай) и **LC** – *Lycium chinense*, полученные из Алматинского технологического университета (Республика Казахстан); **DDW** – лиофильно высушенная, биомасса клеток диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea Wall*) (Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН);
- нутриентный состав рационов: стандартные полнорационные концентрированные сухие комбикорма (Ассортимент-АгроИ и Лабораторкорм, Россия; Sniff, Германия); полуисинтетические рационы с варированием содержания нутриентов – коммерческие (ResearchDiets, США) и разработанные аналоги, составленные из отечественных ингредиентов;
- биотест-системы: культуры клеток (стандартизированные и первичные), эксплантаты куриных эмбрионов, лабораторные животные конвенциональной (филиал «Андреевка» ФГБНУ «НЦБМТ» ФМБА России, ООО «Кролинфо») и SPF (ЦКП «SPF-виварий» ИЦиГ СО РАН) категории: крысы стока Wistar, мыши BALB/c и C57BL/6, морские свинки и свиньи – гибриды Вьетнамских вислобрюхих и Визенау.

В процессе выполнения работы были использованы образцы сравнения: для СМП\_2ф – мясные продукты из свинины с добавлением БАВ\_1; для БАВ\_2 – фармацевтический препарат лиофильно-высушеннный экстракт вилочковой железы крупного рогатого скота.

**Для разработки частных технологий** использовано оборудование Экспериментальной клиники-лаборатории биологически активных веществ животного происхождения и технологического стенда-ФНЦ пищевых систем.

**Методы исследования сырья, СМП и БАВ.** При проведении исследований использовались общепринятые стандартные и оригинальные методики.

Отбор проб сырья осуществляли в соответствии с ГОСТ Р 51447-99, при проведении испытаний соблюдали правила средних проб, каждую пробу исследовали на один показатель трижды (общий химический состав, показатели безопасности) и в пяти повторностях (масс-спектроскопия).

**Общий химический состав:** зола и минеральные вещества по ГОСТ 31727–2012; жир по ГОСТ 23042-2015; влагу по ГОСТ 9793-2016; белок по ГОСТ 25011-2017; аминокислотный состав по ГОСТ 34132-2017; жирнокислотный состав по ГОСТ Р 55483-2013; компоненты стероидной природы методом ГХ на спектрометре Agilent 7890 (США) с плазменно-ионизационным детектором; свободные углеводы хроматографически на системе BioLC (Dionex, Германия); витамины методом ВЭЖХ (325 – 245 нм); кальций и селен методом AAC на спектрометре

Agilent 240Z/280Z; фенольные соединения спектрометрически методом Фолина-Чокальтеу.

*Микробиологические показатели:* КМАФАнМ по ГОСТ 104444.15-94; БГКП по ГОСТ 31747-2012; *S.aureus* по ГОСТ 31746-2012; сальмонеллы по ГОСТ 31659-2012; *E.coli* по ГОСТ Р 30726-2001.

*Токсичные элементы:* свинец и кадмий по МУК 4.1.986-00; мышьяк по ГОСТ Р 51766-2001; ртуть по МУК 4.1.1472-2003; хром по ГОСТ 33425-2015; пестициды по ГОСТ 32308-2013 на хроматографе Agilent 7890 (США) с электронно-захватным директором; антибиотики по ГОСТ Р 55481-2013 на хроматографе Agilent 1200 (США) с МС/МС детектором.

*Протеомные и масс-спектрометрические методы* включали колоночную гель-фильтрацию с использованием хроматографической колонки (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция), заполненной Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) и откалиброванной с помощью стандартных препаратов, коллектора фракций (Bio-Rad, США); хроматографическое разделение белков на хроматографе (Beckman Coulter, США) и системе ВЭЖХ системы жидкостной хроматографии (Waters, США); спектрофотометрические исследования на спектрофотометрах (Shimadzu Corporation, Япония; Biochrom, Великобритания; HTI, США; «ЗОМЗ», Россия), в т.ч. определением общей концентрации белка по методу Кингслея-Вейксельбаума биуретовой реакцией (Brady P.N. et al., 2015); электрофоретическое разделение белков одномерным электрофорезом по Леммли (Laemmli U. K., 1970) и двумерным электрофорезом по О'Фарреллу (O'Farrell R. H., 1975) в камерах (Helicon, США; Bio-Rad, США) с использованием белковых маркеров (Thermo, Латвия); масс-спектрометрическую идентификацию белков на MALDI-спектрометре (Bruker, Германия) с использованием ПО Mascot PeptideFingerprint (MatrixScience, США) по технологии iTRAQ (Wisniewski J.R., 2009), на масс-спектрометре Q-exactive HF (Thermo Scientific, США), поиск, идентификацию пиков и оценку интенсивности пиков репортерных ионов с использованием платформы MaxQuant; биоинформационный анализ с использованием баз данных (NCBI, UniProtProtein DataBase).

*Нутриентную адекватность:* стандартными методами, по аминокислотной и жирнокислотной сбалансированности по показателям и критериям, разработанным Н.Н. Липатовым, И.А. Роговым и А.Б. Лисицыным.

*Методы in vitro:* переваримость по методу А.А. Покровского-И.Д. Ертанова в модификации Н.Н. Липатова (мл); моделирование среды желудочно-кишечного тракта имитацией кислотно-основной среды (Hariyadi D.M. et al, 2016) и пищеварительных жидкостей (Minekus M.etal, 1995) с использованием солей и ферментов (PanreacAppliChem, Германия); биологическую активность на модели ингибирования АПФ по Araujo M.C. (2000) в модификации (Торкова А.А. с соавт., 2012); метод розеткообразования (РОК) на тимоцитах морских свинок и

эритроцитах кролика; определение подавления хемилюминесценции с использованием Lum-100, ПО PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия); флуоресцентный метод на FluoroskanAscent FL (TermoLabsystems, Финляндия).

*Экспериментальные модели ex vivo:* на экспланатах куриных эмбрионов с использованием фазово-контрастного инвертируемого микроскопа (ЛОМО, Россия); на клетках линии НТ-29, солей тяжелых металлов (cadmия и ртути) и ААРН, красителя МТТ с использованием фотометра-флуориметра Synergy 2 (BioTek, США) (540, 690 нм); гепатоцитах морской свинки с использованием микроскопа AxioImager A1, системы анализа AxioVision 4.7.1.0 (CarlZeiss, Германия).

*Экспериментальные модели in vivo:* метаболические сбои с использованием полусинтетических диет: коммерческой D12079B (ResearchDiets, США) и аналогов, составленных из отечественных ингредиентов; алиментарную гиперлипидемию (АГЛ) по методу Котенковой Е.А (2014): на протяжении 100 сут обогащением рациона холестерином (0,5–2,0 %), насыщенными жирами (5,0–19,0 %) и введением внутрижелудочно витамина D2 (35000 МЕ/кг); дислипидемию (ДЛ) однократным введением внутрибрюшинно ТвинХ100 (150 мг/кг массы тела крыс); иммуносупрессию (ИС) трехкратным введением внутрибрюшинно Циклофосфана (Верофарм) (100 мг/кг массы тела крыс) с интервалом 72 ч на протяжении 5 сут введением внутрижелудочно Азатиоприна (Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко) (50 мг/кг массы тела крыс); интрацеребральную посттравматическую гематому (ИПГ) по методике Макаренко А.Н. (2002) хирургически деструкцией в области внутренней капсулы ткани мозга крыс; модель травмы спинного мозга (ТСМ) хирургически левосторонней гемисекцией в нижнегрудном отделе спинного мозга (T10-T11) крыс (Цымбалюк В.И., 2010); модель травмы периферического нерва (ТПН) полной невротомией седалищного нерва крыс; повреждение кожных покровов плоскостными ранами на спине в области лопаток (Mayorgova A., et al., 2018), лоскутными ранами в области лопаток ( $20 \pm 2 \text{ мм}^2$ ).

Группы животных формировались для каждого эксперимента из особей, сопоставимых по возрасту, полу и массе, условиям содержания. Контрольным животным вводили физиологический раствор или контрольные образцы (путь введения, объемы, продолжительность воздействия совпадали с таковыми опытных групп). Выведение животных из эксперимента осуществляли декапитацией или усыплением в камере для эвтаназии (VetTech, Великобритания). Использование лабораторных животных обосновано положительными заключениями локального биоэтического комитета ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

В исследованиях использованы установки НПК Открытая Наука (Россия): «Открытое поле» типа «ринг» и типа «бокс», «темно-светлая камера», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «новая клетка», тест Порсолта. Неврологические функции оценивали по шкалам Stroke-index (McGrow, 1976) в

модификации Кульчикова А.Е. (2008) и Ганнушкиной И.В. (2013); тестом на моторную деятельность крыс по шкале Бассо, Беатти и Бреснана (BBB) (Barros Filho T. E., Molina A. E., 2008) и тестом на седалищную функцию (шкала SFI); тестом удержания на горизонтальном стержне. ПГТТ проводили на фоне 18-часового голодания пероральным введением глюкозы (2 г/кг) глюкометром OneTouch UltraEasy и полосок (LifeScan, ОАЭ) на 0, 5, 10, 15, 30, 60 и 90 мин. Относительную массу внутренних органов рассчитывали как соотношение абсолютной массы органа к абсолютной массе тела. Морфологическое исследование цельной крови проводили на автоматическом анализаторе Abacus juniorvet 2.7 (Diatron Messtechnik GmbH, Австрия); лейкоцитарные показатели на проточном цитофлуориметре Guava easy Cyté (MerchMillipore, Франция). Биохимическое исследование сыворотки крови на анализаторах BioChem FC-360 и BioChemSA (HTT, США), используя наборы реактивов (HTT, США); иммуноферментные исследования сыворотки и плазмы крови на фотометре ImmunoChem2100 (HTI, США), используя видоспецифичные реактивы ELISA; активность антиоксидантных ферментов в крови по скорости окисления восстановительной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом, растворенным в реакционной среде; активность КАТ по уменьшению концентрации перекиси водорода в реакционной среде, активность СОД измерением автоокисления пирогаллола в реакционной смеси; БАСК путем фотометрической оценки угнетения роста *E. coli*. Гистологические и иммуно-гистохимические исследования проводили с помощью микротомов Microm HM-525 и Microm HM-315 (Германия), окрашиванием срезов по стандартным протоколам и их анализом на микроскопе AxioImager A1, системы анализа изображений AxioVision 4.7.1.0 и Olympus BX 51 (Япония); морфометрию проводили в тест-зоне  $270 \times 270 \text{ мкм}^2$ ; изучение ultraструктуры с использованием ультратома (Rinehart, Австрия) и электронного микроскопа JEM-100B (JEOL, Япония).

### **Статистическая обработка данных**

Использованы программы EXCEL 2013, STATISTICA 12, SPSS. Результаты представлены в виде среднего значения ( $M$ ), стандартного отклонения ( $\pm m$ ); медианы ( $Me$ ), значений межквартильного размаха (P25-P75). Достоверность различий между группами статистически оценивали с использованием однопараметрического ANOVA теста, непараметрического U-критерия (Манна-Уитни), одностороннего анализа Крускала-Уоллиса, разницу считали достоверной для  $p < 0,05$ .

### **Глава 4. Научное обоснование технологических подходов к разработке частных технологий специализированного продукта и капсулированного функционального ингредиента**

В главе приведены технологические подходы к повышению качественных характеристик специализированных продуктов и функциональных добавок

#### **A. Разработка систем доставки на основе биосовместимых носителей**

Ввиду того, что эпителий желудочно-кишечного тракта является физическим и биохимическим барьером, а биодоступность препаратов белковой природы при пероральном поступлении не превышает 2 % (Ryan J.T., 2011), проведена работа по подбору системы таргетной доставки биоактивных соединений белковой природы. Основными целями являлись: (1) обеспечение сохранности белковых молекул от агрессивной среды ЖКТ, без нарушения их целостности и свойств, (2) высвобождение и удерживание их в целевом месте абсорбции – тонком кишечнике, где высвобожденные белки и пептиды за счет трансцитоза могут оказывать как местные, так и системные эффекты. Пилотный эксперимент был направлен на выбор оптимального носителя путем изучения свойств систем доставки на основе агарозы по (Wang N., 1997) и альгината по (Manjanna K.M., 2010). Технология белок-полисахаридных комплексов детально описана в тексте диссертации.

**Таблица 1. Характеристики полимерных капсул с использованием альгината натрия (NaAlg)**

[NaAlg], %	[CaCl <sub>2</sub> ], %	Внешний вид, консистенция
0,5	1,0	Овальной формы, Мягкие, не сохраняют структуру
	1,5	
	2,0	
1,0	1,0	Овальной формы, плотные
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2,0	<b>Сферической формы, упругие</b>
1,5	1,0	Полусферической формы, плотные
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2,0	<b>Сферической формы, упругие</b>
2,0	1,0	Полусферической формы, упругие
	1,5	Полусферической формы, упругие
	2,0	Сферической формы, плотные

высушеннном виде имел вид чешуек желтоватого цвета размером 1,7 – 2,0 мм; альгинатные капсулы (концентрация кальция хлорида 2 %; степень включения – 71 ± 1 %) представляли собой гранулы белого цвета диаметром 1 – 1,5 мм.

Предложена технология подбора метода инкупсулирования белково-пептидных комплексов в биосовместимые носители.

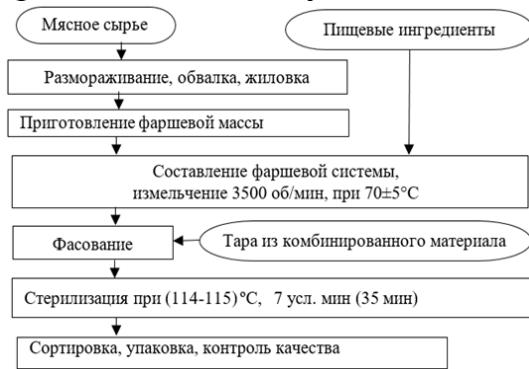
### **Б. Разработка частной технологии специализированного продукта**

Перспективной технологией специализированных и функциональных продуктов является обогащение биоактивными пептидами, предложенное Arihara K. (2006). Гидролизаты куриного белка, содержащие глипролины, обладают иммуномодулирующими, цитопротекторными и гипотензивными свойствами (Möller N. P. et al, 2008; Wicher H., 2009). Проведена работа по разработке рецептуры и подбору технологических режимов производства СМП\_2 с включением БАВ\_2: определено оптимальное количество вносимого гидролизата (2,0 %), сокращено количество поваренной соли (0,3 %), скорректирована

Для определения оптимального состава кальций-альгинатных капсул изучен процесс формирования капсул (Таблица 1). Установлено, что сферическая форма капсул с оптимальным соотношением толщина/диаметр достигалась при концентрации альгината натрия в растворе 1–1,5 %.

Агарозный гидрогель с включенными образцами (степень включения 80 ± 2 %) в

консистенция. Технологический процесс и модифицированный рецептурный состав экспериментальных образцов (из свинины / прижизненно модифицированной свинины с/без добавления БАВ\_1 в количестве 2,0 %) представлен на Рисунке 2 и полностью описан в тексте диссертации.



Ингредиент, %	КМП	КМПф	СМП_2	СМП_2ф
<b>Свинина</b>	65	65		
<b>Свинина от свиней-реконвалесцентов</b>			65	65
<b>Гидролизат куриного белка</b>		2		2
<b>Крахмал</b>			3	
<b>Поваренная соль</b>			0,3	
<b>Вода питьевая</b>			До 100	

**Рисунок 2 - Технологическая схема производства (слева) и ингредиентный состав (справа) экспериментального специализированного мясного продукта**

Выработанные образцы соответствовали требованиям качества и безопасности, предъявляемым к аналогичным по виду продуктам по показателям промышленной стерильности и содержанию токсичных элементов.

## Глава 5. Теоретическое и экспериментальное обоснование методологии оценки свойств биологически активных веществ, функциональных и специализированных продуктов и разработка алгоритма исследования их эффективности

В главе приведены современные методические подходы к исследованию эффективности специализированных и функциональных пищевых продуктов и биологически активных веществ методами *in vivo*, *in vitro* и *ex vivo*. Систематизированы методы тестирования, оценки и подтверждения заявленных характеристик, проведен критический анализ используемых методик и сформулирована принципиальная схема, включающая основные физико-химические и биохимические исследования состава ФИ, БАВ и СМП для прогнозирования их биологических свойств. Проанализированы основные виды физиологических эффектов на организменном уровне, а также суммарные (интегральные) показатели, характеризующие их биологическую активность. Выбор экспериментальных биотест-систем *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для оценки специфических свойств и эффективности БАВ, функциональных и специализированных продуктов на организменном, органном и клеточном уровнях осуществляли в соответствии со следующей описательной моделью: (1) обзор известных методов и принципа исследования; (2) характеристика биотест системы; (3) определение хода исследования и параметры оценки развивающихся нарушений; (4) выявление основных маркеров, характеризующих нарушения. Подробное описание и

протоколы экспериментов по апробации методов представлены в тексте диссертации.

#### **A. Физико-химические и биохимические методы анализа**

В главе детально рассмотрены методы, применяемые сегодня для изучения биоактивных соединений, содержащихся в сырье, функциональных и специализированных пищевых продуктах. С помощью сравнительного протеомного анализа мясного сырья и головного мозга свиней реконвалесцентов выявлены маркерные белки. Проведен анализ современных критериев оценки жирнокислотного и аминокислотного состава, определены критерии нутриентной адекватности, которые могут применяться как для мясного сырья и отдельных ингредиентов, так и для многокомпонентных продуктов питания, в т. ч. специализированных и функциональных, с целью сопоставления разрабатываемых продуктов с медико-биологическими требованиями.

#### **B. Модели *in vitro***

Обоснована модель кислотно-основной среды отделов ЖКТ путем апробации трех моделей на разработанных белок-полисахаридных матрицах. Рассмотрены основные статичные и динамические модели для изучения переваривания нутриентов продуктов и сырья, в т.ч. функциональных белков. Экспериментально обоснован спектрофотометрический метод, позволяющий путем ферментной реакции определить остаточную активность АПФ с использованием в качестве эталона каптоприла. Рассмотрена стратегия определения антиоксидантной активности, в качестве основных выбраны фотометрический (FRAP), флуоресцентный (ORAC и TEAC) и хемилюминесцентный методы. Воспроизведен метод изучения иммунотропной активности: показано, что фармацевтическая субстанция в 73 % случаях восстанавливал количество розеткообразующих клеток не менее чем на 40 % по сравнению с контролем.

#### **C. Модели *ex vivo***

Экспериментально обоснованы методы оценки пролиферативной активности: показано что образец СМП\_1, полученный после модели переваривания *in vitro*, стимулировал пролиферацию клеток эксплантов тканей сердца и сосудов крыс до 20 % и эксплантов куринных эмбрионов более 50 % по сравнению с контролем; цитопротективных свойств: на клетках НТ-29 определены оптимальные цитотоксические концентрации солей ртути и ионов кадмия; мембранотропной активности: на гепатоцитах морской свинки установлена активность образца СМП\_1, полученного после *in vitro* переваривания, достигающая 154% (500 нг на мл среды).

#### **D. Модели *in vivo***

а) Экспериментальное воспроизведение метаболических сбоев у лабораторных мышей и крыс

Варырование углеводной и жировой составляющей рациона проводили на самках мышей C57BL/6 (14 нед., n=28), сформированных на группы, содержащиеся при равных условиях и потреблявших: контрольный рацион (KD: белок – 5,7 ккал/%, жир – 2,2 ккал/%, углеводы – 16,0 ккал/%, калорийность – 3,2 ккал/г); коммерческую западную диету (WD: белок – 17,0 и 16,9 ккал/%, жир – 40,0 и 40,1 ккал/%, углеводы – 43,0 ккал/%, калорийность – 4,7 ккал/г); аналог западной диеты (WDa, калорийность – 4,7 ккал/г); рацион с высоким уровнем сахарозы (SD: белок – 21,0 ккал/%, жир – 11,9 ккал/%, углеводы – 67,1 ккал/%, калорийность – 3,9 ккал/г). Рационы предоставлялись *ad libitum*, мышей взвешивали, учитывали потребленный корм и воду, тестировали в установках «новая клетка» и «темно-светлая камера» (19 сут), проводили тест Порсолта (20, 21 сут). На 22 сут проводили ПГТТ. На 23 сут завершали эксперимент, определяя массы внутренних органов, гематологические и биохимические показатели крови.

Установлено, что WDa и WD по сравнению с KD не вызывают достоверного увеличения массы тела и изменения относительной массы внутренних органов; снижают толерантность к глюкозе (средняя площадь под кривой увеличивалась в 1,4 раза); повышают ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП и ХС не-ЛПВП и не-ЛПНП (более чем на 40 %, 30 %, 25 %, 70 % соответственно); вызывают стеатоз печени (плотность окрашивания печени ORO увеличивалось до 60 %; активность АЛТ и АСТ – более чем на 20%); вызывают близкое к достоверному увеличение %GRA и увеличение продолжительности флоатинга (в 1,4, p<0,05) и в 1,3 раза, p=0,07). SD вызывала нарушения утилизации глюкозы и поведения (средняя площадь под кривой и время флоатинга превышала KD в 1,2 и 1,4 раза, p<0,05).

Основными маркерами, характеризующими функциональные нарушения по типу «неалкогольного стеатоза печени», выбраны: тест Порсолта, ПГТТ, WBC, %GRA, ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ХС не-ЛПВП и не-ЛПНП, АсАт, АлАт, гистологическое исследование печени (ORO). Установлено, что данная модель, ввиду своей краткосрочности (24 сут) может быть использована для изучения протективных и терапевтических эффектов специализированных и функциональных пищевых продуктов, биоактивных веществ, способствующих нормализации липидного и углеводного обмена. Минусом данных моделей является малое количество биоматериала для проведения исследований ввиду использования лабораторных мышей.

Модель АГЛ воспроизводили на крысах-самцах Wistar ((380±20) г) путем варырования жировой составляющей рациона (n=15) на протяжении 98 сут (белок – (26,1 – 30,0) ккал/%, жир – (24,3 – 83,0) ккал/%, углеводы – (18,0 – 21,1) ккал/%, калорийность – (63,3 – 115,0) ккал/г, с 14 нед. крыс кормили стандартным рационом. Интактные крысы (n=10) содержались при равных условиях, потребляли стандартный рацион (белок – 26,5 ккал/%, жир – 24,3 ккал/%, углеводы – 47,6 ккал/%, калорийность – 63,3 ккал/г). Рационы предоставлялись *ad libitum*.

*libitum*, на 106 и 120 сут определяли относительную массу внутренних органов, гематологические, биохимические показатели крови, антиоксидантный статус организма.

При моделировании АГЛ у животных выявлены значительные колебания массы тела: с 1 по 5 нед. увеличение в среднем от 5,5 до 22,5 г/нед.; с 7 по 13 нед. значительное снижение от 32,7 г до 71,1 г/нед.; с 13 по 16 нед. увеличение на 6,1 г/нед., на 17 нед. снижение на 4,0 г/нед. Наибольшая разница отмечена на 1, 3, 13 и 14 нед. – масса крыс с АГЛ превышала массу интакта на 5,1 % ( $p=0,085$ ), 5,5 % ( $p=0,142$ ), 9,9 % ( $p=0,113$ ) и 7,0 % ( $p=0,121$ ) соответственно. У крыс с АГЛ по сравнению с интактом выявлено: на 106 сут увеличение MID, GRAN, %GRA, %MON, GRAN/LIM (в 4; 3,2; 1,8 и 2,7 раза,  $p<0,05$ ), эритроцитов, гемоглобина и гематокрита (в 1,2 раза,  $p<0,05$ ), активности липазы (в 3,8 раза,  $p<0,05$ ), концентрации ОХС (в 2,2 раза,  $p<0,05$ ), ХС ЛПНП (на 24,2 %,  $p<0,05$ ) и ХС не-ЛПНП и не-ЛПНП (в 15,8 раза,  $p<0,05$ ), ИА (в 2,2 раза,  $p<0,05$ ), МДА (на 24,7 %,  $p>0,05$ ), снижении АОА (в 2,1 раза,  $p<0,05$ ); на 120 сут увеличение GRAN, %GRA, %MON, GRAN/LIM (в 1,5; 1,7; 3 и 2 раза,  $p<0,05$ ), активности липазы (в 2,8 раза,  $p<0,05$ ), концентрации ОХС (в 1,6 раза,  $p<0,05$ ), ХС ЛПНП (в 1,4 раза,  $p<0,05$ ) и ХС не-ЛПНП и не-ЛПНП (в 2,5 раза,  $p<0,05$ ), ИА (в 1,7 раза,  $p<0,05$ ), МДА (на 60,9 %,  $p<0,05$ ), снижении АОА (на 36,5 %,  $p<0,05$ ). Достоверных изменений относительной массы органов не выявлено.

Таким образом, модель АГЛ путем варьирования жирового компонента рациона на протяжении 98 сут, позволяет воспроизвести нарушения липидного обмена, сохраняющиеся в течение 21 сут и может быть использована для изучения медленнодействующих БАВ, специализированных и функциональных продуктов. Основными маркерами, характеризующими функциональные нарушения при АГЛ, являются: масса тела, WBC, %LIM, %GRA, %MON, ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ХС не-ЛПНП и не-ЛПНП, ИА, АОА, МДА.

Экспериментально апробирована модель «быстрой» ДЛ на крысах-самцах Wistar ((220±5) г), распределенных на группы: интакт, содержащиеся при равных условиях ( $n=8$ ); животные, которым вводили Тритон X-100 ( $n=20$ ). У крыс с ДС выявлено статистически значимое увеличение MID и %МI в 2 и 3 раза через 24 ч, прогрессирующие до 2,7 и 6,3 раза через 48 ч; RBC, НСТ и МСНС на 13 %, до 8 % и на 4% через 24 ч, частично сохраняющиеся через 48 ч (МСНС до 6%); снижение PLT, РСТ и MPV на 24%, 40 % и до 5 % через 24 ч, частично сохраняющиеся через 48 ч (PLT на 16 % и РСТ 40 %). Через 24 ч установлено увеличение общего билирубина в 1,6 раза, активности АсАт и АлАт на 19 % и 33,0 %; ОХС в 1,8 раза, ХС ЛПНП в 3,7 раза; ХС ЛПВП на 63 % при снижении ТГ в 2,4 раза, некоторые из которых сохранялись до 48 ч (увеличение общего билирубина на 70 %, ОХС в 1,5 раза, ХС ЛПНП на 37 % и ХС ЛПВП до 29 % при снижении ТГ в 3 раза). Данная модель ввиду своей кратковременности позволяет изучить

профилактические (введение индуктора после предварительного насыщения организма исследуемым веществом) свойства объектов с выраженными гиполипидемическими эффектами. В качестве основных маркеров, характеризующих функциональные нарушения, определены: WBC, MID, AcAt, АлАт, ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ТГ, ИА.

*b) Экспериментальное моделирование повреждений центральной и периферической нервной системы*

Для воспроизведения повреждения ЦНС экспериментально обоснована хирургическая модель ИПГ на крысах-самцах Wistar ((220±10) г, n=30): интактных, ложнооперированных (ЛОЖ), контрольных. В течение 14 сут эксперимента оценивали степень тяжести развивающихся нарушений, используя балльные шкалы Stroke-index McGraw (2, 4, 7, 10, 13 сут); тесты «Открытое поле» типа «Бокс» (0, 2, 3, 6, 7, 10, 11 и 13 сут); тест удержания на горизонтальном стержне (0, 2, 6, 10 и 13 сут). На 15 сут проводили гематологические и биохимические исследования крови, гистологические исследования тканей головного мозга.

Общая летальность модели составила 43,7 %, критическими являлись 1, 5, 12-14 сут. Выявлен широкий спектр проявлений неврологических нарушений: на 2 сут после операции у 28 % крыс – коматозное состояние, у 72 % параличи и парезы контролateralных конечностей, манежные движения, одно- и двусторонний птоз и экзофтальм (сохранялись вплоть до 14 сут: тяжелая степень – у 10% крыс, средняя и легкая степень – у 50% и 40% крыс); нарушения моторных функций (у 30 % крыс, сохраняющиеся до 13 сут); торможение периодов адаптации и поведения (на 2 и 3 сут резко снижалась горизонтальная и вертикальная активность, исследовательское поведение отсутствовало до 7 сут); потеря массы тела до 10 сут (на 9,5 % p= 0,085; на 4 и 7 сут на 20,5 %, p=0,006 и 20,7 %, p=0,008); увеличение MID в 1,89 раза (p=0,002), %GRA в 2,6 раза (p=0,126), MCV на 4,0 % (p=0,191), глюкозы на 66,4 % (p=0,029) и ОХС на 17,8 % (p=0,044), уменьшение %LIM на 13,6 % (p=0,089); альбумина на 8 % (p=0,005), креатинина на 15,6 % (p=0,159) и АлАт на 44,2 % (p=0,014; в ипсолатеральном полушарии мозга – значительные количества погибших нейронов и глии (до 45 % и 14%, p≤0,05), выжившие нейроны в состоянии острого отека с деформированными ядрами и признаками деструкции, глиальные клетки структурно изменены.

Таким образом, модель ИПГ в достаточно полной мере отображает наблюдаемую в клинике ситуацию и воспроизводит основные диагностические критерии ОНМК, сохраняющиеся в течение 14 сут, и может быть применима для изучения путей диетокоррекции повреждений ЦНС. Для оценки дегенеративных изменений при ИПГ предложены следующие показатели: масса тела, неврологический статус, двигательная активность, показатели крови (WBC,

%LIM, %GRA, MID, RBC, HGB, HCT, MCV, PLT, PCT; общий белок, альбумин, глюкоза, креатинин, АсАт, АлАт, ОХС); нейроглиальный индекс.

Для обоснования моделей ТСМ и ТПН использовали крыс-самцов Wistar ((260±10) г, n=48), распределенных на группы: интакт, ЛОЖ, контроль. Функционально значимое восстановление оценивали по шкалам BBB (для ТСМ) и SFI (для ТПН) ежемесячно, состояние тканей в области травмы гистологическими, морфометрическими и ультраструктурными методами через 4 мес.

У крыс с ТСМ выявлено частичное восстановление спинного мозга через 4 мес. (баллы по шкале BBB ниже интакта на 48,7 %, p<0,01). Гистологически с ипсилатеральной (поврежденной) и контралатеральной стороны выявлен единый организованный очаг, в смежных к травме участках – уменьшение плотности нервных волокон и гибель нейронов; заполнение зоны травмы глиальным рубцом, увеличение плотности кровеносных сосудов. Установлено снижение плотности нервных волокон в ипсилатеральных (на 78 % относительно интакта, p<0,01) и контрлатеральных участках (на 56 % относительно интакта, на 55 % относительно ЛОЖ, p<0,01) боковых трактов спинного мозга. Ультраструктурными маркерами оценки дегенеративных изменений при ТСМ являлись: отек миелиновых оболочек, их локальное отслоение от осевого цилиндра, уменьшение количества и деструкция элементов цитоскелета осевых цилиндрах, отек и кристолиз митохондрий в нейронах задних рогов спинного мозга; снижение среднего количества ламелл миелина (в 6 раз относительно интакта, p<0,01); апоптоз, интрацеллюлярный отек глиоцитов; регенеративные процессы на уровне единичных нервных волокон.

У крыс с ТПН отмечено восстановление функции травмированного нерва (показатели шкалы SFI через 4 мес. составляли (34,7±5,8) баллов). Гистоморфологически выявлено уменьшение количества нервных волокон в проксимальном отделе травмированного нерва (на 42,5 % от интакта, p<0,01), изменение строения нервных волокон (гиперимпрегнирование, тонкие миелиновые оболочки, пролиферация шванновских клеток и фибробластов) и эпиневрия (пролиферация фибробластов, накопление коллагена, инфильтрация нейтрофилов и макрофагов); фокальное расслоение и нарушение поперечной исчерченности мышечных волокон, отек цитоплазмы и дезорганизация саркомеров, снижение плотности митохондрий миосимпластов, инвагинация мембранны миоядер.

Таким образом, для моделей ТСМ и ТПН в качестве маркеров выбраны: показатели по шкалам BBB и SFI; структурная организация участка травмированного спинного мозга и седалищного нерва, в т.ч.ультраструктурная. Рассмотренные модели воспроизведения травмы спинного мозга и периферического нерва могут быть как самостоятельным методом, так и использоваться в составе комплексной методики подтверждения регенерационной

способности исследуемых продуктов и ингредиентов, обладающих нейропротекторными эффектами действия.

*c) Экспериментальное воспроизведение вторичных иммунодефицитных состояний*

Проведен сравнительный анализ циклофосфамидной и азатиоприновой моделей с использованием крыс-самцов Wistar ( $(220 \pm 5)$  г, n=60), распределенных на группы: животные, которым вводили Циклофосфан; животные, которым вводили Азатиоприн; интакт. Динамику развития ИС оценивали спустя 12 сут после введения индукторов, стойкость модели на 19 сут – гематологическими, биохимическими и иммуноферментными методами, расчетом относительной массы внутренних органов.

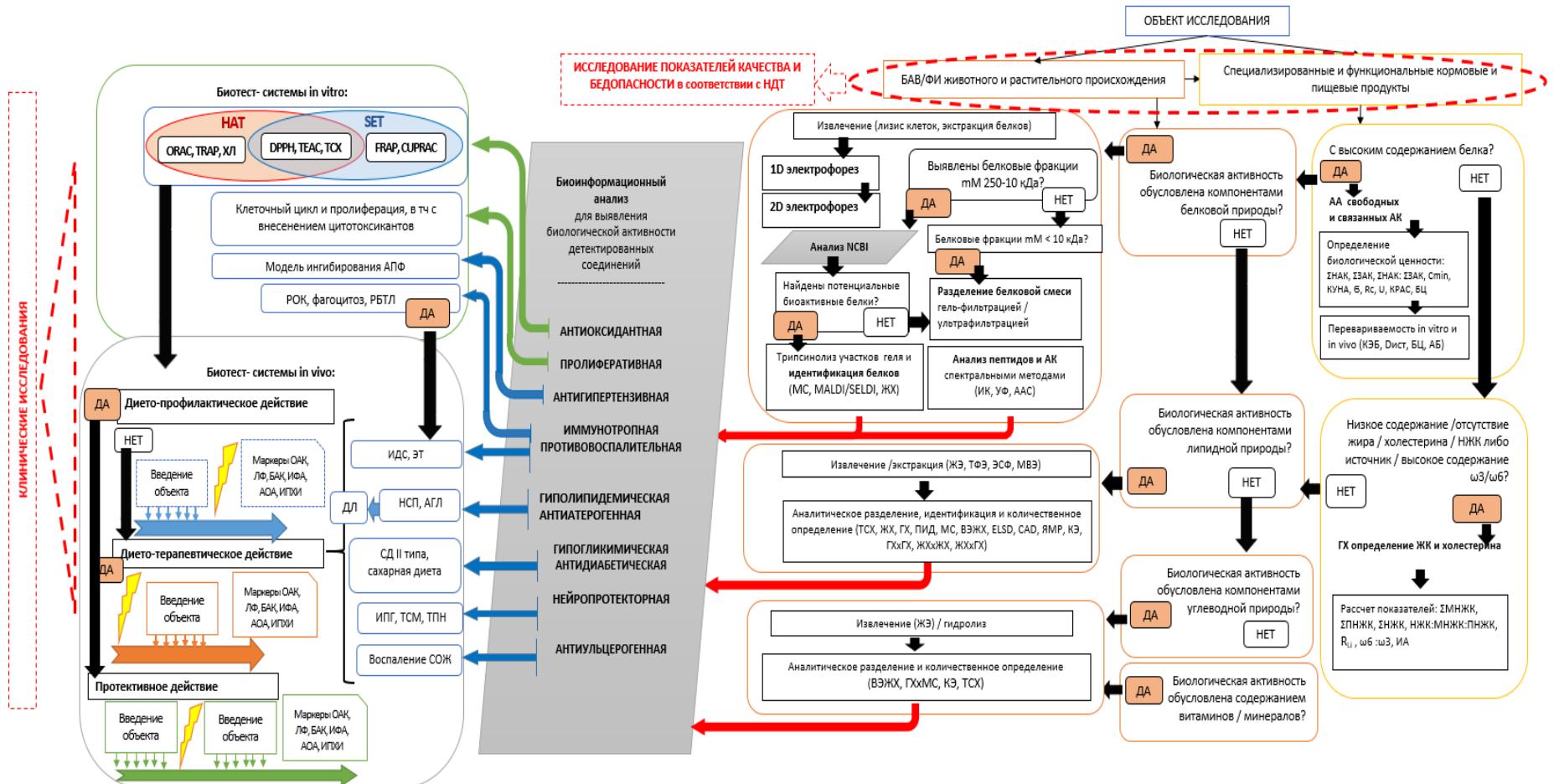
Выявлено, что Азатиоприн не оказывает влияние на функциональные показатели лейкоцитов, но увеличивает относительно интакта тромбоцитарные индексы крови (MCV, PLT и PCT на 5,3 %, 55,1 % и 40,5 %, p<0,001), активность печеночных ферментов (АсАт, амилазы, АлАт и ЩФ на 19,7 % (p=0,195), на 70,0 %, в 2 и 1,2 раза (p<0,05) и относительную массу печени (на 30,4 %, p= 0,032). Циклофосфан вызывал все признаки острой медикаментозной иммуносупрессии: лейкопения (78,7 % от интакта), агранулоцитоз (42,9 % от интакта), моноцитоз (76 % от интакта), в т.ч. атрофию тимуса. Сохранность модели наблюдалась до 19 сут, что позволяет оценить влияние различных соединений и продуктов питания на иммунные реакции в опытах *in vivo*. В качестве маркеров развития функциональных нарушений и оценки иммунного статуса выбраны: WBC, GRA, MON, их соотношения, CD3+, CD4+, CD8+; IgA, IgM, IgG; IL-2, IL-4, IL-6.

*d) Экспериментальное воспроизведение модели повреждения кожных покровов*

Воспроизведены плоскостные (у мышей ( $20 \pm 2$ ) г, n=18, 9 сут) и лоскутные (у морских свинок ( $380 \pm 20$ ) г, n=10, 14 сут) раны. Эффективность моделей оценивали на примере заражения раны *P. aeruginosa* ( $1 \times 10^6$  КОЕ), определяли скорость заживления раневой поверхности и тензиометрические показатели. Плоскостные раны характеризовались отсутствием воспалительных реакций, фаза эпителизации: на 4 сут, образование рубца: на 6 – 8 сут; масса груза, необходимого для разрыва рубца: 220 [184 – 250] г; гистологически: разрастание соединительнотканной основы дермы с накоплением фибробластов, незначительное восстановление волоссяных фолликулов. Лоскутные раны характеризовались незначительными воспалительными реакциями, фаза эпителизации: на 4 сут, образование рубца – на 12 – 14 сут, гистологически выявлена выраженная васкуляризация, накопление фибробластов, отсутствие волоссяных фолликулов. Зараженные раны затягивались медленнее, характеризовались незначительными воспалительными реакциями без гнойно-эксудативных процессов. Достоверных изменений гематологических показателей для данных моделей не выявлено. В качестве маркеров развития функциональных

нарушений кожи и оценки регенеративных процессов выбраны: визуальная оценка процессов ранозаживления; тензиометрия; гистологически: накопление клеточных элементов, фибробластов, состояние волоссяных фолликулов.

На основании проведенных экспериментальных исследований разработан алгоритм и общие принципы процедуры исследования специфической активности биоактивных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе, который может быть использован как комплексный подход с сочетанием различных методов и интегральных показателей (рисунок 2).



**Примечание:** АА - аминокислотный анализ; АК - аминокислоты; НАК - незаменимые аминокислоты; ЗАК - заменимые аминокислоты; Стмп - минимальный скор; КУНА - коэффициент утилитарности й-незаменимой аминокислоты; б - коэффициент утилитарности белка; У - коэффициент сопоставимой избыточности; Рс - коэффициент рациональности аминокислотного состава; КРАС - коэффициент разбалансированности аминокислотного состава; БЦ - биологическая ценность; КЭБ - коэффициента эффективности белка; Дист - истинная усвояемость азота; АБ - азотистый баланс; ЖК - жирные кислоты; НЖК - насыщенные жирные кислоты; ПНЖК - полиненасыщенные жирные кислоты; РЛJ - жирнокислотная сбалансированность; ИА - индекс атерогенности; МС - масс-спектрометрический анализ; MALDI - десорбционный метод «мягкой» ионизации; SELDI- лазерная десорбция / ионизация с улучшенной поверхностью; ЖХ - жидкостная хроматография; ИК - инфракрасная спектроскопия; УФ - спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях; ААС - атомно-абсорбционная спектроскопия; ЖЭ - жидкостная экстракция; ТЭФ - твердофазовая экстракция; ЭСФ - сверхкритическая флюидная экстракция; МВЭ - микроволновая экстракция; ТХ - тонкослойная хроматография; ГХ - газовая хроматография; ПИД - пламенно-ионизационный детектор; ВЭЖХ - высокоселективная жидкостная хроматография; ELSD - детекторы по светорассеянию испарённого образца; CAD - детекторы заряженного аэрозоля; ЯМР - ядерный магнитный резонанс; КЭ - капилярный электрофорез; ORAC - способность к абсорбции кислородных радикалов; ТРАП - общая способность к улавливанию радикалов; ХЛ - хемилуминесцентные методы; DPPH - изменения концентрации стабильного 2, 2-дифенил-1-пирролидиазил радикала; ТЕАС - метод определения эквивалентов Тролокса; FRAP - железовосстанавливающая/антискисцантная способность; СУРРАС - метод измерения комплексов с Cu(II); НАТ - передача атома водорода; SET - передача электрона; АПФ - антигенитен-превращающий фермент; РОК - розеткообразующие клетки; РБТЛ - реакция бласт трансформации лимфоцитов; ИДС - иммунодепрессивные состояния; ЭТ-эндотоксин; ДЛ - дислипидемия; НСП - неаклогольный стеатоз печени; АГЛ - алиментарная гиперлипидемия; СД - сахарный диабет; ИЛГ - интрацеребральная посттравматическая гематома; ТСН - травма спинного мозга; СОЖ - слизистая оболочка желудка; ОАК - общий анализ крови; ЛФ - лейкоцитарная формула; БАК - биохимический анализ крови; ИФА - иммуноферментный анализ; АОА - показатели антиоксидантной защиты; ИЛХИ - интегральные показатели хронической интоксикации.

### **Рисунок 3 - Алгоритм и общие принципы процедуры исследования специфической активности биологически активных веществ, функциональных и специализированных пищевых продуктов на их основе**

## **Глава 6. Экспериментальное применение алгоритма для оценки свойств функциональных ингредиентов и специализированных продуктов**

Разработанный Алгоритм был успешно апробирован на функциональных ингредиентах и специализированных и функциональных пищевых продуктах,

### **А. Биологически активные ингредиенты растительного происхождения**

В соответствии с Алгоритмом для выявления биоактивных компонентов у ягод годжи LB и LC применены общие химические и хроматографические методы, а также методы *in vitro* и *in vivo* – для изучения биологических свойств (модель АГЛ).

Состав биоактивных компонентов, в т. ч. витаминов, минералов и стероидов представлен в тексте диссертации. *In vitro* показано, что для ягод LC характерна антиокислительная (10,24 – 1,30 Ки против 6,02 – 7,44 Ки) и дисмутазная (152,24 – 166,79 Е/мг против 136,05 – 147,05 Е/мг) активность, для ягод LB – каталазная активность (20,31 – 29,49 Е/г против 10,59 – 17,9 Е/г). В результате эксперимента *in vivo* установлено, что ягоды (20 % от углеводной составляющей рациона) в течении 28 и 86 сут обладают разнонаправленными эффектами. Ягоды LB – выраженным антиоксидантным эффектом снижая концентрацию МДА (на 46 % относительно контроля и на 25 % относительно LC), увеличивая отношение ОХ ЛПВП к ОХС; ягоды LC – гиполипидемическим, снижая через 28 сут ОХС и ОХ ЛПНП (на 44 % и 35 % относительно контроля и на 47 % и 40% относительно LB) и увеличивая ОХ ЛПВП (более чем на 40% относительно контроля и LB).

В соответствии с Алгоритмом проводили исследования биомассы DDW, содержащей значительные количества стероидных гликозидов, обладающих различными биологическими эффектами, в т.ч. антиоксидантным и нормализующим липидный обмен. 10%-ый CO<sub>2</sub>-экстракт DDW характеризовался значительной антиоксидантной активностью: FRAP – 718,4 мкмоль-экв дигидрокверцетина/л; ORAC – 664,2 мкмоль-экв Trolox/л. В результате проведенного эксперимента *in vivo* показано, что введение в рацион крыс с моделью ДС на протяжении 14 сут 10%-ой суспензии DDW (1 мл/кг массы тела) оказывал противоспалительный (снижение GRAN на 44,6 %, %GRA на 27,5 %, GRAN /LYM на 38,0 %, при увеличении MON на 41,6%) и гиполипидемический (снижение ТГ более чем на 30 % и ИА на 18,4 %). Таким образом, показано различие свойств ягод Годжи от региона произрастания.

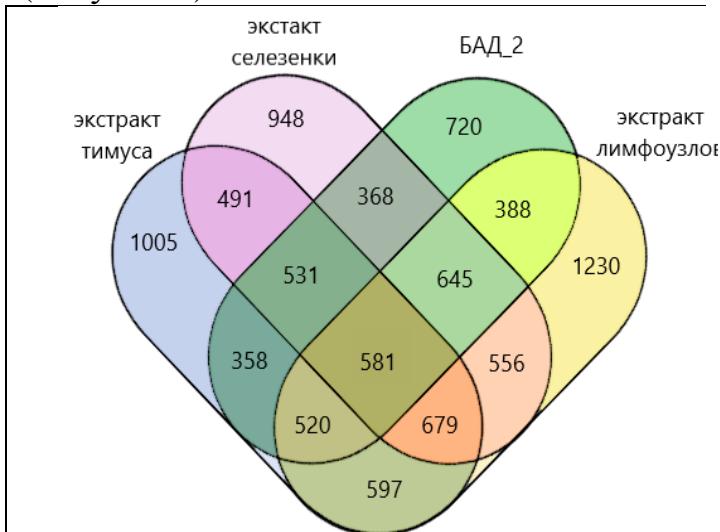
Полученные данные позволяют рекомендовать диоскорею дельтовидную и ягоды годжи *Lycium chinense* для коррекции дисдиридемий, а при нарушениях антиоксидантного статуса ягоды годжи *Lycium barbarum*.

### **Б. Биологически активные ингредиенты животного происхождения**

В соответствии с алгоритмом для выявления потенциальных биоактивных компонентов БАВ\_1 были применены физико-химические (гель-фильтрация, электрофоретические и масс-спектрометрические, спектрофотометрические и спектрофлуорометрические) методы, для подтверждения цитопротективных и пролиферативных свойств – метод *ex vivo*, для гипотензивных свойств – метод *in vitro*.

В БАВ\_1 выявлены в незначительном количестве изоформы кератинов (две фракции с Мм 55 кДа), значительные количества полипептидов (5 – 10 кДа и менее 2,5 кДа), короткие пептиды и свободные аминокислоты. В экспериментах *in vitro* показан достоверный цитопротективный и пролиферативный эффекты БАВ\_1 при концентрациях (0,25 – 2,0) мг/мл и (0,5 – 2,0) мг/мл, а также гипотензивное действие при концентрации в реакционной среде – 1,1 мг/мл (4,30 нг экв. каптоприла /г сух. в.). На примере БАВ\_1 установлена эффективность применения разработанного Алгоритма для определения оптимальной методологии исследований гидролизатов белка и подтверждена целесообразность использования БАВ\_1 в качестве функционального ингредиента в технологии специализированного мясного продукта для коррекции патологий центральной и периферической нервной системы.

Ввиду того, что биологическую активность веществ белковой природы в клеточной среде определяет их структура для выявления биоактивных компонентов БАВ\_2 применен количественный протеомный анализ iTraq. Схема эксперимента и репрезентативные результаты идентификации масс-спектрометров представлены в тексте диссертационной работы. Всего из меченых образцов было идентифицировано 747 белков, количественно определено было 720 (96 %) белков. Сопоставление идентифицированных соединений БАВ\_2 с 1005 соединениями экстракта тимуса, 948 – экстракта селезенки и 1230 – экстракта лимфатических узлов выявило, что порядка 580 белков присущи иммунным органам, из которых 102, 121 и 211 белков было уникальными для селезенки, тимуса и лимфатических узлов (Рисунок 4).



**Рисунок 4. Диаграммы Венна пептидов, идентифицированных для БАВ\_2 и экстрактов иммунных органов свиньи**

Выявлено 128 (17 %) не охарактеризованных белков, 112 (15 %) структурных белков, 60 (8 %) различных ферментов и порядка 400 функциональных белков (>50 %). В результате биоинформационного анализа оценено 370 функционально значимых белков БАВ\_2, включенных в механизм иммунного ответа, стимулирующих метаболические процессы в организме и проявляющих антиоксидантные и противо-воспалительные свойства. Среди идентифицированных белков 30 % (222), 16 % (116), 10 % (74), 1 % (70), 7 % (49) и 5 % (40) белков состояли из 1-, 2-, 3-, 4-, 5- и 6 уникальных пептидов соответственно.

Распределение идентифицированных белков по молекулярным массам: 13 соединений с Мм более 200 кДа, 42 – от 200 до 100 кДа, 178 – от 100 до 50 кДа; 215 – от 50 до 30 кДа, 357 – от 30 до 10 кДа и 13 – с Мм менее 10 кДа. Максимальное

количество функционально активных соединений отмечено в диапазоне молекулярных масс менее 30 кДа, что было показано ранее (Fedulova L., 2018).

В соответствии с Алгоритмом проведены исследования биокорректирующих свойств БАВ\_2 – тимической активности – методами *in vitro*; мембранотропной – *ex vivo*, иммуномодулирующей – *in vivo*. Установлено, что БАВ\_2 и фракция ≤30кДа обладает выраженной биологической активностью: тимическая активность была соотносима с фармацевтическим препаратом (при снижении среднеарифметического числа РОК на фоне повреждения их мембран трипсином восстанавливала количество РОК более чем в 50% случаев не менее чем на 40 %); мембранотропная активность превышала 150 %.

Исследование БАВ\_2 и фракции ≤30кДа в эксперименте *in vivo* выявили особенности гендерного влияния на иммунные функции крыс SPF-категории с моделью циклофасфамидной ИС. БАВ\_2 достоверно повышал: у самцов – LIM в 3,7 раза, MON в 3,0 раза, GRA в 5,0 раза, CD4 и CD8 в 2,7 и 2,6 раза; у самок – LIM в 12,3 раза, MON в 4,0 раза, GRA в 25,1 раза, CD4 в 13,9 раза и CD8 в 21,1 раза; фракция ≤30кДа достоверно увеличивала: у самцов – LIM в 4,6 раза, GRA в 12,1 раза, CD4 в 3,7 раза и CD8 в 21,1 раза; у самок – LIM в 6,0 раза, GRA в 9,0 раза, CD4 и CD8 в 6,1 раза в 10,9 раза. Также у самцов и самок, получавших БАВ\_2 относительно крыс с ИС показано достоверное увеличение IL-2 в 2,2 и в 2,9 раза соответственно, C1q в 1,2 и 1,1 раза, C5 в 1,9 и 3,1 раза при уменьшении содержания IL-4 в 0,9 и в 0,8 раза, IL-6 в 0,6 раз, C3 в 0,9 и 0,8 раз. У самцов и самок, получавших фракцию ≤30 кДа, относительно крыс с ИДС показано статистически значимое увеличение IL-2 в 3,1 и 2,5 раза, C1q в 1,1 и 1,3 раза, C5 в 2,6 и 4,1 раза, уменьшение IL-4 в 0,5 раза, IL-6 в 0,4 раза, C3 в 0,9 и 0,3 раза.

Показан позитивный эффект БАВ\_2 и фракции: при нарушениях количественного состава клеток периферической крови – у самок крыс в сравнении с самцами; БАВ\_2: при цитокиновом дисбалансе – у самцов, в случае нарушений системы комплемента – у самок. Фракция ≤30кДа эффективна для коррекции регуляторных нарушений иммунной системы в одинаковой степени вне гендерной принадлежности, что позволяет рекомендовать ее в качестве универсального средства.

## **В. Пищевые продукты специализированного действия**

Применение Алгоритма в отношении СМП\_1, обладающего доказанным биокорректирующим эффектом, выявило целесообразность анализа его нутритивной адекватности. Установлены низкие значения БЦ и аминокислотной сбалансированности. При этом количественное отношение НЖК превышено для лиц, страдающих ССЗ, соотношение ω-6 к ω-3 жирных кислот приближено к оптимальному, индекс атерогенности, тромбогенности и здоровья – значительные (Таблица 2).

В соответствии с Алгоритмом биокорректирующий эффект СМП\_1 в эксперименте *in vivo* проверяли на мышах, потребляющих WDa. Оценивая диетопротекторные и

диетотерапевтические свойства (5 г/голову) по ПГТГ, относительной массе органов, поведенческих тестов, липидному спектру сыворотки крови, гистологии печени.

**Таблица 2. Результаты изучения нутриентной сбалансированности СМП\_1**

Показатель	Заданные требования	СМП_1
<b>Показатели химического состава</b>		
Белок, г/100 г	15-20	17,7
Жир, г/100 г	10,0-15,0	6,6
Углеводы, г/100 г	3,0-5,0	3,0
Соотношение белок : жир	1 : (0,8-0,9)	1 : 0,4
Калорийность, ккал/100 г	150,0-200,0	146,2
Поваренная соль, г/100 г	0,4-0,6	
<b>Показатели аминокислотной сбалансированности</b>		
ΣНАК, г/100г белка	-	78,2
ΣЗАК, г/100г белка	-	100,6
Содержание лизина, г/ 100г белка*	4,5	8,7
ΣНАК: ΣЗАК	-	1 : 1,3
Аминокислотный скор, дол. ед. ( $C_{min}$ )	→ 1	0,6
Коэффициент утилитарности белка, дол. ед. (Б)	→ 100	62,1
Коэффициент сопоставимой избыточности, г/100 г белка (U)	→ 0	0,4
КРАС, %	→ 0	90,3
БЦ, %	→100	9,7
<b>Показатели жирнокислотной сбалансированности</b>		
ΣНЖК, г/100г жира	22,0-27,0	50,5
ΣМНЖК, г/100г жира	25,0-40,0	35,2
ΣПНЖК, г/100г жира	18,0-25,0	11,0
НЖК:МНЖК:ПНЖК	3:6:1→1:1:1	4,6:3,2:1
Соотношение ω6 : ω3	5-10:1	7:1
Соотношение C18:2ω6 : C18:2ω3	>20	16,3
C20:5ω3+C22:5ω3	-	0,7
Холестерин, мг/100 г продукта	35,0 →10-15	17,5
Индекс атерогенности	>2	0,6
Индекс тромбогенности	>2,5	1,2
Соотношение гипо- к гиперхолестеринемическим ЖК	-	1,4
Индекс здоровья	0,2 -1,8	1,3

СМП\_1 обладал протекторными эффектами при введении в рацион на протяжении 24 сут параллельно с WDa: не влияя на динамику массы тела и лейкоцитарный профиль, способствовал достоверному снижению ОХС (на 44 %), ХС ЛПНП (на 74,8 %), ИА сыворотки крови (на 22,6 %); повышению ХС ЛПВП (на 33,2 % (р=0,038); сокращению длительности латентного периода в teste Порсолта, снижению степени стеатоза печени (на 22,3 %), повышению активности печеночных ферментов (АсАт, АлАт более чем на 10 %). Терапевтические свойства при введении в рацион после развития метаболических нарушений на протяжении 14 сут были менее выраженные: при отсутствии изменений массы тела и лейкоцитарного профиля отмечено достоверное снижение ОХС (на 22,3 %), ХС ЛПНП (на 22,6 %), ИА сыворотки крови (на 17,9 %); повышению ХС ЛПВП (на 16,6 % (р=0,143); частичная нормализация толерантности к глюкозе, уменьшение массы висцерального жира, снижение степени стеатоза печени (на 36,7 % относительно WDa).

В соответствии с Алгоритмом оценивали нутриентную адекватность экспериментальных продуктов: КМП – из свинины; КМПф из свинины с добавлением гидролизата БАВ\_1 (2 %); СМП\_2 – из прижизненно модифицированной свинины; СМП\_2ф – из прижизненно модифицированной свинины, обогащенной БАВ\_1 (2 %). Обогащение мясного продукта БАВ\_1 не приводило к значимым изменениям состава и показателей нутриентной адекватности. Величина гипотензивной активности СМП-2ф составила 0,31 нг экв. каптоприла/г сух. в. (в 100 г продукта  $23,610 \pm 0,042$  % сухих веществ) против 0,25 нг экв. каптоприла/г сух. в. в образцах СМП-2, КМП и КМПф.

В эксперименте *in vivo* показано, что СМП\_2ф при потреблении (5 г/голову) на протяжении 14 сут после ИПГ способствовал нормализации массы тела (привесы превышали значения крыс с ИПГ в 3,3 раза), снижению степени тяжести проявлений неврологического дефицита (тяжелые проявления неврологических нарушений не выявлялись на 7 сут (у 40 % крыс с ИПГ сохранялись вплоть до 10 – 11 сут (70 % набирали 9 – 11 баллов, 30 % – 7 – 9 баллов), средняя степень тяжести неврологического дефицита проявлялась на 2 – 3 сут у 60 % крыс, начиная с 4 и по 11 сут у 40 %; легкая симптоматика выявлена на 2 – 3 сут у 43 % и на 10 – 11 сут у 83 % крыс; способствовал восстановлению мышечного тонуса на 4 сут; нормализации двигательной активности (на 4 сут у 40 % крыс отмечалось увеличение данных показателей до 20 %, у 20 % – снижение до 65 %; на 11 сут суммарные показатели двигательной активности и норкового рефлекса были соотносимы с интактом); снижению реакции тревоги и фобического компонента эмоционального статуса (время нахождения крыс в открытых рукавах лабиринта увеличивалось в 9,0 раза относительно крыс с ИПГ при уменьшении заходов в темных рукавах лабиринта на 26,9 % относительно крыс с ИПГ). Установлено повышение функциональной активности иммунных клеток крови (снижение %LIM до 15 % ( $p < 0,05$ ), повышение %GRAN выше 30%) и эритроцитов.

СМП\_2ф достоверно нивелировал процессы нейродегенерации (снижал отек нейронов, функционально активировал нейроны: увеличивал их площадь и тинкториальные свойства базофильного вещества нейронов (активный синтез белка). Анализ ультраструктуры неокортекса животных с ИПГ и при диетотерапии СМП\_2ф не выявил существенной разницы между группами сравнения: на уровне нервных клеток и кортикальных гемокапилляров отмечалось развитие значительных структурно-морфологических нарушений, которые имели диффузный характер и характеризовались отеком цитоплазмы, хроматолизом и кариолизисом, некрозом клеток и окружающий нервных волокон, особенно вокруг гемокапилляров.

Выявлено положительное влияние на динамику восстановления после перенесенной травмы спинного мозга и периферического нерва в отдаленные периоды. Через 1 мес после ТСН индекс достоверно не отличался от контроля, через 3 и 4 мес – превышал контроль на 22,1 %, и 36,3 % ( $p < 0,05$ ). Через 1 мес после гемисекции спинного мозга функциональные показатели по шкале BBB у крыс, потреблявших СМП\_2ф, соответствовали  $4,9 \pm 0,7$  баллам, а через 4 мес –  $13,1 \pm 1,1$ , превышая контроль на 19,5 %

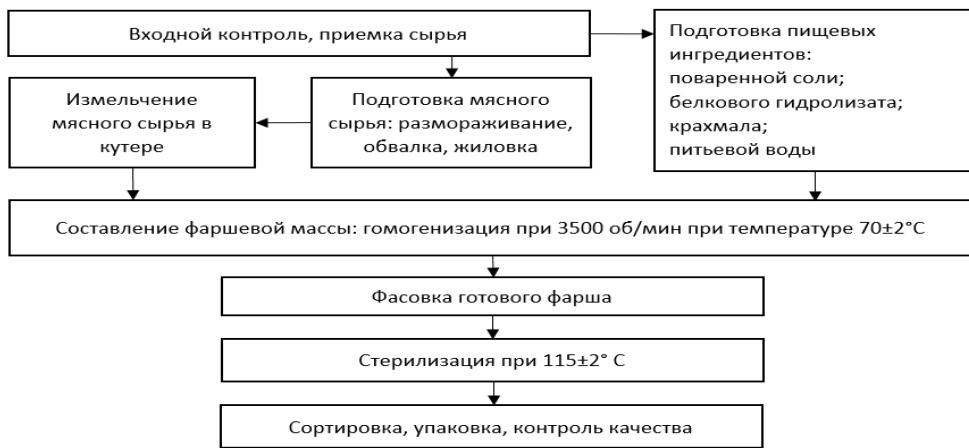
( $p < 0,05$ ). Через 4 мес после травмы выявлены признаки активации глиальных клеток и регенерации нервных волокон: увеличение количества безмиelinовых нервных волокон, кластерной регенерации, миелинизации нервных волокон, уровня пиноцитозной активности глиальных клеток; количество ламелл миелина в регенерированных нервных волокнах составляло  $19,9 \pm 2,6$  ламелл/волокно (в 2 раза больше ( $p < 0,01$ ), чем в контроле); регрессом очагового отека ткани спинного мозга и некроза структурно-функциональных единиц спинного мозга.

СМП\_2ф способствовал регенерации седалищного нерва после полной его невротомии и шивания: нервные волокна регенерировали кластерами или поодиночке, шванновские клетки и фибробласты активно пролиферировали; количество нервных волокон в проксимальном и дистальном отделах превышало контроль на 16,9 % и 23,1 % ( $p < 0,05$ ); выявлено увеличение относительной плотности частично сохраненных и восстановленных саркомеров, увеличение количества межфибрillлярных митохондрий, частичное восстановление длины и площади саркомеров ( $1,91 \pm 0,08$  мкм<sup>2</sup> и  $15,44 \pm 0,98$  мкм<sup>2</sup> против  $2,10 \pm 0,11$  мкм<sup>2</sup> и  $11,98 \pm 1,01$  мкм<sup>2</sup> в контроле), частичное восстановление функциональных показателей микроциркуляторного русла.

Таким образом, СМП\_2ф из прижизненно-модифицированной свинины с добавлением гидролизата куриного белка (БАВ\_1) при введении в рацион на протяжении 14 сут (5 г/голову) оказывает восстановительный эффект на процессы регенерации структурных компонентов нервной системы при травматическом повреждении центральной и периферической нервной систем крыс. При ИПГ нивелирует проявления тяжелых неврологических нарушений и восстанавливает мышечный тонус на 7 сут, снижает реакцию тревоги и фобический компонент, нормализует двигательную активность на 14 сут, способствует нормализации метаболизма и активирует метаболическую активность нейронов коры мозга. При ТСМ и ТПН положительно влияет на динамику восстановления функциональной активности в отдаленные периоды за счет активации глиальных клеток спинного мозга и трофической поддержки кровеносных сосудов и мышц.

## **Глава 7. Разработка частной технологии специализированного продукта и добавки функционального назначения**

На основании рецептуры специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья, обогащенного белковым гидролизатом, включающего: свинину жилованную полужирную (с массовой долей жировой ткани не более 30 %), полученную от свиней-реконвалесцентов – не более 65 %, гидролизат куриного белка – не менее 2 %, крахмал – не более 3 %, соль – от 0,3 до 0,5 %, были изготовлены опытно-промышленные партии консервов. Технологический процесс описан в тексте диссертации и представлен на Рисунке 5.



**Рисунок 5 – Блок-схема производства опытно-промышленной партии обогащенного специализированного мясного продукта из прижизненно-модифицированного сырья**

Характеристика продукции представлена в Таблице 3. По органолептическим и физико-химическим показателям консервы соответствовали требованиям ГОСТ 34177. Хранение упакованных продуктов производят в соответствии с правилами хранения, утвержденными в установленном порядке, при температуре от 0 до 20 °C и относительной влажности воздуха ( $75 \pm 5$  %), срок годности – не более 6 мес., после вскрытия рекомендуется хранить не более 48 ч при температуре от 0 до 6 °C.

**Таблица 3. Органолептические и физико-химические показатели для обогащенных специализированных фаршевых консервов из свинины**

Показатель	Характеристика
<b>Внешний вид</b>	Монолитный, однородный, равномерно перемешанный мясной фарш, розового цвета разной интенсивности, без серых пятен, пустот и свободного бульона, без видимых включений соединительной ткани. Бульон прозрачный, допускается наличие взвешенных белковых веществ в виде хлопьев. Размеры частиц не более 0,3 мм.
<b>Запах и вкус</b>	Свойственные свинине, вкус слабосоленый, без посторонних запаха и вкуса
<b>Консистенция</b>	Сочная, некрошивая, упругая
<b>Посторонние примеси</b>	Не допускаются
<b>Массовая доля свинины (по закладке), %, не менее</b>	65,0
<b>Массовая доля белкового гидролизата (по закладке), %, не менее</b>	2,0
<b>Массовая доля белка, %, не менее</b>	10,0
<b>Массовая доля жира, %, не более</b>	10,0
<b>Массовая доля крахмала (по закладке), %, не более</b>	3,0
<b>Массовая доля хлористого натрия (поваренной соли), %</b>	От 0,3 до 0,5 включ.

Выработанные мясные продукты соответствовали требованиям Технического регламента Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013) в части качества и безопасности. Оптово-отпускная цена 1 банки специализированного мясного продукта составляет 40,44 руб.

Для разработки функциональной добавки был проведен эксперимент по подбору оптимальных условий иммобилизации БАВ\_2: подбор концентраций альгината натрия и сшивающего агента для обеспечения более полной сорбции соединений белковой природы. Установлено, что капсулы с наилучшими функциональными свойствами образовались при концентрации альгината натрия – 1,2 %, максимальная степень включения БАВ\_2 в капсулы наблюдалась при концентрации 0,5 % кальция хлорида – (88±2) %. Конечная технология представлена в тексте диссертации. На модели кислотно-основной среды ЖКТ с последующим изучением пролиферативной активности *in vitro* показано, что максимальное высвобождение целевых веществ из капсул происходило в среде с pH 7,4, соответствующей тонкому кишечнику (82,0 %) (рисунок 6В), высвобожденные из капсул биоактивные комплексы способствовали увеличению площади периферической зоны тканей слизистой оболочки желудка куриного эмбриона (рисунок 6Г).



В соответствии с Алгоритмом проведено исследование альгинатных капсул с включенным БАВ\_2 *in vivo* на поросятах-отъемышах трех пометов ( $n=25$ ), сформированных на опытную (1) группу, включавших маловесных поросят ( $n=15$ ; массой 1,70[1,37 – 1,85] кг), которым перорально индивидуально вводили ФКП (200 мг/голову); контрольную (2) группу, включавшую крупных поросят ( $n=10$ ; массой 2,72 [2,22 – 2,95] кг), которым перорально индивидуально вводили эквивалентный объем воды. На протяжении 28 сут животные потребляли полнорационный

комбикорм СК-7 (Россия). На 0, 7, 14 и 21 сут выполняли взвешивание и ветеринарный осмотр поросят, на 0, 14 и 28 сут проводили исследование крови.

На 3 и 4 нед. масса тела животных (1) увеличивалась на 33,1% ( $p<0,001$ ) и 12,2 % ( $p=0,064$ ) относительно (2). На 14 сут у животных (1) выявлено снижение общего белка на 6,0 % ( $p=0,005$ ), альбумина на 12,2% ( $p=0,002$ ), креатинина на 9,5% ( $p=0,023$ ), мочевины на 38,8% ( $p<0,001$ ); у животных (2) – снижение общего белка на 5,0 % ( $p=0,028$ ), альбумина на 17,2 % ( $p=0,013$ ), креатинина и мочевины на 23,1 % и 48,9% ( $p=0,005$ ). При межгрупповом сравнении у животных (1) на 14 и 28 сут выявлено увеличение альбумина (на 12,3 % и 16,8 %); мочевины (на 17,1 % и 38,5 %); на 28 сут – белка (на 11,5 %). На 14 сут у животных (1) и (2) отмечено снижение ОХС на 27,6 % ( $p<0,001$ ) и на 33,9 % ( $p=0,007$ ), глюкозы на 68,1 % ( $p=0,036$ ) и на 73,4% ( $p=0,005$ ); на 28 сут у животных (2) – увеличение ТГ на 52,2 % ( $p=0,012$ ). На 14 сут у поросят (1) снижалась активность АсАт на 37,5 % ( $p=0,027$ ), АлАт на 42,1 % ( $p<0,001$ ), ЛДГ на 25,2 % ( $p=0,005$ ), ЩФ на 61,8 % ( $p<0,001$ ), на 28 сут относительно 14 сут активность ЛДГ и ЩФ увеличивалась на 22,9 % ( $p=0,017$ ) и на 52,0 % ( $p=0,025$ ); у поросят (2) снижалась активность ГГТ на 26,3 % ( $p=0,013$ ) и ЩФ на 52,6 % ( $p=0,007$ ). При межгрупповом сравнении у животных (1) в начале эксперимента отмечено увеличение прямого билирубина на 41,9 %, АСТ на 36,7 %, АЛТ на 44,5% и ЛДГ на 21,1 %; на 14 сут – увеличение прямого билирубина на 35,0 %; на 28 сут – увеличение активности ГГТ на 31,2 % и ЩФ на 50,4 %.

Фенотипирование лейкоцитов выявило отсутствие достоверных изменений как при межгрупповом сравнении, так и при сравнении показателей на 14 и 28 сут. Иммуноферментный анализ уровня цитокинов в сыворотке крови животных (2) выявил увеличение уровня IL-2 на 14 сут относительно 0 сут на 70,2 % и на 28 сут относительно 14 сут – на 25,2 %; уровень IL-4 увеличивался на 28 сут относительно 14 сут на 82,0 %. Показана высокая бактерицидная активность сыворотки крови животных (1) - 52,34 [50,47 – 53,27] против 71,03 [62,15– 82,24] для контроля.

У поросят (1) отмечено на 14 сут относительно 0 сут увеличение RBC и HGB на 25,1 % и на 29,1 % ( $p<0,001$ ), НСТ на 23,9 % ( $p=0,004$ ); снижение PLT на 25,1 % ( $p<0,001$ ) и РСТ на 31,9% ( $p=0,004$ ); на 28 сут относительно 14 сут – снижение PLT на 34,4 % ( $p=0,003$ ) и РСТ на 34,7 % ( $p=0,014$ ); у поросят группы 2 на 14 сут относительно 0 сут – уменьшение PLT на 40,0 % ( $p=0,007$ ), РСТ на 35,6 % ( $p=0,007$ ) и MPV на 16,3 % ( $p=0,014$ ); на 28 сут относительно 14 сут – увеличение HGB на 21,2 % ( $p<0,001$ ). Межгрупповое сравнение выявило: увеличение РСТ и MPV на 22,4 % и 15,7 % ( $p<0,05$ ) на 14 сут у поросят (1).

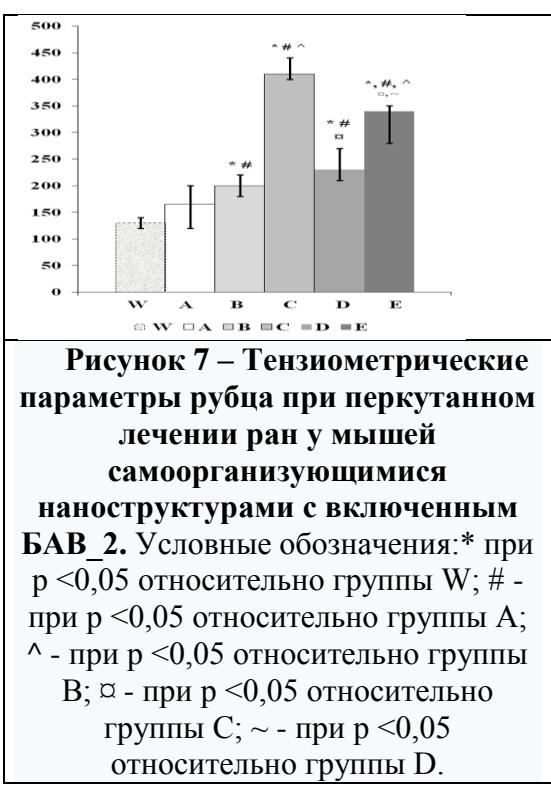
В результате доказана эффективность альгинатных капсул с включенным БАВ\_2 в качестве иммуномодулятора и подтверждена адресность доставки БАВ\_2 в отдел тонкого кишечника и высвобождение его в течение 230 мин. Поросята-отъемыши достигали массы контрольных животных, преодолев первоначальную разницу в 1,6 раза; установлено повышение функциональной активности гуморального звена иммунитета (увеличение IL 2 и 4, БАСК при неизмененном количестве лейкоцитов и

юных клеток); положительное влияние на адаптацию метаболизма при переходе от молозива на твердую пищу за счет повышения функциональной активности печени и синтеза белка. Оптово-отпускная цена 1 кг биологически активной добавки составляет 11 248,4 руб, оптово-отпускная цена одной пластиковой банки емкостью 0,15 л – 1687,30 руб. Курсовой прием 3 мес. будет стоить 1687,30 руб

Для изучения эффективности самоорганизующихсяnanoструктур с включенными биоактивными соединениями БАВ\_2 – лиотропных жидким кристаллов (ЛЖК) и микроэмulsionей (МК) для перкутанного использования, полученные по технологии Мурашовой Н.М. (2017) (рисунок 5 А, Б); проведено исследование *in vivo* на мышах (интактных – М, n = 11) с моделью плоскостной раны (n=57), сформированных на группы: W – контрольные мыши (n = 9), не получавшие лечения; A – мыши с лечением метилурациловой мазью (n = 10); В – мыши с лечением ЛЖК «пустышка» (n=9); С – мыши с лечением ЛЖК, содержащий БАВ\_2 (n=10); D – мыши с лечением МК «пустышка» (n=10); Е – мыши с лечением МК, содержащий БАВ\_2 (n=9). На 9 сут выполняли гематологические, тензиометрические и гистологические исследования.

Терапия ЛЖК и МК с включенными БАВ\_2 приводила к заметному снижению образования рубцов относительно всех групп сравнения. Относительно контроля (группа W) прочность рубца увеличивалась в группе В и D на 53,8 % и на 76,9 %, группе С и Е на 215,4 % и на 161,5 %, достоверной разницы относительно группы А не выявлено ( $p=0,0916$ ). По сравнению с мышами, получавшими метилурациловую мазь, прочность рубцов была выше в группе В и D на 21,2 % и на 39,4 %, в группе С

и Е на 148,5 % и на 106,1 %. По сравнению с мышами, получавшими лечение «пустышками»: в отношении ЛЖК (группа В) – тензиометрические значения были выше в группе С и Е на 105,0 % и на 70,0 %, различий между группой В и D не выявлено ( $p=0,0541$ ); в отношении МК (группа С) – тензиометрические параметры рубца были ниже в группе D и Е на 43,9% и 17,1%; отмечено снижение плотности рубца в группе D относительно Е на 32,4% ( $p=0,0025$ ) (рисунок 7). Гистологически показано: у мышей групп А и D сохранение архитектоники дермы, наличие коллагеновых волокон, эластические волокна либо истончены и фрагментированы, либо уплотнены, количество фибробластов значительное; у мышей групп В, С и Е – максимальная реэпителизация, хорошо организованная грануляционная соединительная ткань, состоящая из слоя горизонтально



ориентированных волокон и фибробластов, эпидермис представлен многослойным плоским ороговевающим эпителием, в местах выхода волос на поверхность кожи стержни волос заплетены слоями кератина, сальные железы образуют комплексы с волосяными фолликулами; у мышей группы С хорошо видны микрососуды и сеть капилляров.

Более выраженные эффекты жидких кристаллов относительно микроэмulsionей обусловлены их большей вязкостью и медленной диффузией. За счет этого происходит более пролонгированное действие веществ. Кроме того, функциональные белки, проникая в кровяное русло непосредственно через фолликулы, могут запускать каскад реакций, активизируя покоящиеся стволовые клетки, которые, в свою очередь, становятся клетками-предшественниками и обеспечивают более эффективную эпидермальную стратификацию, сопровождающуюся нивелированием нарушений местного и системного гомеостаза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Сформулированы и научно обоснованы стратегии разработки пищевых продуктов функционального и специализированного действия на основании биотехнологических подходов к извлечению, сохранению и доставке биологически активных веществ.

2. На основании сравнительного анализа подобраны, испытаны, адаптированы методики и экспериментально обоснованы методики для изучения специфической активности и молекулярно-биологических механизмов действия биологически активных ингредиентов, специализированных и функциональных пищевых продуктов, включая перевариваемость, гипотензивную, тимическую и антиоксидантную активность (*in vitro*), пролиферативную, цитопротективную и мембранотропную активность (*ex vivo*) и иммунотропную, противовоспалительную, гиполипидемическую, гипогликемическую, нейропротекторную активность (*in vivo*). Оригинальность метода моделирования алиментарной гиперлипидемии и атеросклероза подтверждается патентом № 2524127.

3. Разработан алгоритм и общие принципы процедуры исследования, позволяющие изучить специфическую активность функциональных и специализированных пищевых продуктов с учетом природы и направленности действия биоактивных веществ, входящих в их состав. Проведена практическая апробация Алгоритма на пищевых ингредиентах (коммерческий гидролизат куриного белка, ягоды годжи, биомасса клеток диоскореи дельтовидной) и продуктах с потенциально специализированным свойствами (белково-пептидный комплекс, полученный из иммунных органов свиней, консервах мясных стерилизованных фаршевых для снижения риска развития и последствий цереброваскулярной патологии; для снижения риска развития и последствий гиперлипидемии и атеросклероза; для диетотерапии патологий центральной и периферической нервной системы), показала его эффективность. Алгоритм

позволяет оптимизировать комплекс исследований и показателей, специфичных для конкретного продукта, упростить и ускорить выбор специфичных для конкретного продукта методов и направлений исследования, что позволяет полностью и всесторонне изучить заявляемые характеристики. На основе проведенных исследований разработаны и утверждены методические рекомендации по экспериментальному моделированию сердечно-сосудистых заболеваний у лабораторных животных, программа и методики оценки эффективности биологически активных веществ животного происхождения и мясных специализированных продуктов.

4. Разработана оригинальная технология специализированного мясного продукта, содержащего трофинотропные “tissue-engineering” белковые факторы, обогащенного полипептидами куриного белка. В экспериментах *in vitro* выявлена гипотензивная, цитопротективная и пролиферативная активности. На крысах с травмами центральной и периферической нервной системы показан высокий потенциал изучаемого продукта: при введении в рацион (5 г/голову, 14 сут) нивелирует проявления тяжелых неврологических нарушений, восстанавливает мышечный тонус и двигательную активность на 4 сут, снижает реакцию тревоги и фобический компонент, активирует метаболическую активность нейронов коры мозга. Повышает показатели функциональной активности в отдаленные периоды: через 4 мес. относительно контрольного продукта отмечено превышение показателей на 36,3 % при травме спинного мозга, на 19,5% при травме периферического нерва. Выявлена активация глиальных клеток и трофики – кровеносных сосудов и мышц.

5. Проведена опытно-промышленная апробация разработанных технологий и методов подтверждения специфической активности специализированного мясного продукта, обогащенного гидролизатом белка. Результаты введены в ГОСТ Р 1.7.036-1.006.16 «Продукция пищевая специализированная. Консервы мясные стерилизованные фаршевые биокорректирующего действия. Технические условия», учтены при разработке лабораторного регламента на производство Функционального мясного продукта / 2018. Оригинальность подтверждается патентом № 2550649. Расчетная себестоимость/цена 1 банки специализированного мясного продукта (100 г) составляет 40,44 руб.

6. В качестве путей повышения эффективности предложено использование технологии микрокапсулирования с управляемым процессом доставки и высвобождения вещества в заданном отделе желудочно-кишечного тракта. В исследованиях *in vivo* на поросятах-отъемышах была доказана эффективность инкапсулированной функциональной добавки: животные опытной группы достигали веса контроля, преодолев первоначальную разницу в 1,6 раза, также отмечен рост показателей иммунной активности компонентов крови (БАСК на 26,0 %; выработка цитокинов IL-2 и 4 более чем в 1,5 раза) при неизмененном количестве лейкоцитов и юных иммунокомpetентных клеток, что указывает на повышение функциональной активности прежде всего гуморального звена иммунной защиты организма. Данные

технологии позволяют расширить возможности применения и повысить биодоступность белковых соединений природного происхождения.

7. Технология самоорганизующихся жидкких кристаллов впервые предложена для перкутанного использования белково-пептидных комплексов. Показано более быстрое заживление ран при терапии лецитиновыми жидкими кристаллами и микроэмulsionью за счет выраженной резорбции биоактивных белково-пептидных комплексов через кожу. Прочность рубца увеличивалась при терапии лиотропными жидкими кристаллами и микроэмulsionью на 215,4 % и 161,5 % по сравнению с животными без лечения.

8. Проведена опытно-промышленная апробация разработанных технологий и методов подтверждения специфической активности капсулированной функциональной добавки. Оптово-отпускная цена 1 кг биологически активной добавки составляет 11 248,4 руб, оптово-отпускная цена одной пластиковой банки емкостью 0,15 л – 1687,30 руб.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНО В СЛЕДУЮЩИХ РАБОТАХ:**

### **Монографии**

1. Горлов, И.Ф. Разработка и внедрение инновационных технологий производства, переработки и создания конкурентоспособной мясной и молочной продукции нового поколения / И.Ф. Горлов, Н.И. Мосолова, Е.Ю. Злобина, Н.С. Пряничникова, Д.А. Ранделин, **Л.В. Федулова** / Поволжский научно-исследовательский институт производства и переработки мясомолочной продукции ФГБОУ ВПО; Волгоградский государственный технический университет; Всероссийский научно-исследовательский институт мясной промышленности им. В.М. Горбатова; Волгоградское научное издательство. (ISBN: 978-5-00072-111-7) – Волгоград, 2015. – 151 с.

2. Лисицын, А.Б. Прижизненное формирование состава и свойств животного сырья / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, О.И. Лунина, **Л.В. Федулова** / Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. (ISBN: 978-5-901768-45-7) – Москва, 2018. – 440 с.

### **Статьи, индексируемые в международных базах данных Web of Science и Scopus**

1. Basov, A. Sus Scrofa immune tissues as a new source of bioactive substances for skin wound healing / A. Basov, **L. Fedulova**, E. Vasilevskaya, E. Trofimova, N. Murashova, S. Dzhimak // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2020. doi:10.1016/j.sjbs.2020.12.028 (Scopus: Q1, SJR 2019=0,65)

2. Veniaminova, E. Prefrontal cortex inflammation and liver pathologies accompany cognitive and motor deficits following Western diet consumption in non-obese female mice / E. Veniaminova, M. Oplatchikova, L. Bettendorff, E. Kotenkova, A. Lysko, E. Vasilevskaya, A.V. Kalueff, **L. Fedulova**, A. Umriukhin, K.-P. Lesch, D.C. Anthony, T. Strekalova // Life Sciences. – 2020. – 241:117163. doi:10.1016/j.lfs.2019.117163 (Scopus: Q1, SJR 2019=1,03)

3. Basov, A. Deuterium-depleted water influence on the isotope<sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H regulation in body and individual adaptation / A. Basov, **L. Fedulova**, M. Baryshev, S. Dzhimak // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – № 8. – P. 1903. doi:10.3390/nu11081903 (Scopus: Q1, SJR 2019=1,33)

4. Chernukha, I.M. The study of biological effects of different geographical origin goji berries in rats with alimentary hypercholesterolemia / I.M. Chernukha, E.A. Kotenkova, E.R. Vasilevskaya, A.N. Ivakin, A.B.

Lisitsyn, L.V. **Fedulova** // Voprosy pitaniia. – 2020. – Vol. 89. – № 1. – P. 37 – 45. doi:10.24411/0042-8833-2020-10004 (Web of Science; Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

5. **Fedulova, L.V.** Gender difference response of male and female immunodeficiency rats treated with tissue-specific biomolecules / L.V. Fedulova, A.A. Basov, E.R. Vasilevskaya, S.S. Dzhimak // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2019. – Vol. 20. – № 3. – P. 245 – 253. doi:10.2174/1389201020666190222184814 (Scopus: Q2, SJR 2019=0,50)

6. **Fedulova, L.V.** Lecithin lyotropic liquid crystals as a system for biomolecules of animal origin delivery / L.V. Fedulova, N.M. Murashova, E.R. Vasilevskaya, V.A. Pchelkina, A.A. Novikova, E.V. Iyrtov // Russian Journal of Biopharmaceuticals. – 2019. – T.11. – № 5. – C. 19 – 23. (Scopus: Q4, SJR 2019=0,11)

7. Chernukha, I.M. Hypolipidemic and anti-inflammatory effects of aorta and heart tissues of cattle and pigs in the atherosclerosis rat model / I.M. Chernukha, **L.V. Fedulova**, E.A. Kotenkova, S. Takeda, R. Sakata // Animal Science Journal. – 2018. – Vol. 89. – № 5. – P. 784 – 793. doi:10.1111/asj.12986. (Scopus: Q1, SJR 2019=0,88)

8. Dzhimak, S.S. Influence of deuterium-depleted water on hepatorenal toxicity / S.S. Dzhimak, A.A. Basov, A.A. Elkina, **L.V. Fedulova**, E.A. Kotenkova, E.R. Vasilevskaya, O.M. Lyasota, M.G. Baryshev // Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. – 2018. – Vol. 13. – № 2. – e69557. doi:10.5812/jjnpp.69557 (Web of Science; Scopus: Q2, SJR 2019=0,23)

9. Chernukha, I. Hypolipidemic action of the meat product: In vivo study / I. Chernukha, **L. Fedulova**, E. Kotenkova, A. Akhremko // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2018. – Vol. 12. – № 1. – P. 566 – 569. doi:10.5219/959 (Scopus, Q3: SJR 2019=0,27)

10. **Fedulova, L.V.** The influence of cooked sausage with inulin on the physiological indicators of laboratory animals / **L.V. Fedulova**, E.K. Tunieva, V.V. Nasonova, E.A. Kotenkova // Carpathian Journal of Food Science and Technology. – 2018. – Vol. 10 – № 4. – P. 5 – 15. (Scopus, Q4, SJR 2019=0,14)

11. Zobkova, Z.S. The protein biological value of curd produced with transglutaminase and specificities of its impact on growing rats / Z.S. Zobkova, **L.V. Fedulova**, T.P. Fursova, D.V. Zenina, E.A. Kotenkova // Voprosy Pitania. – 2018. – Vol. 87. – № 2. – P. 44 – 52. doi:10.24411/0042-8833-2018-10018 (Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

12. Kravtsov, A.A. Effect of drinking ration with reduced deuterium content on brain tissue prooxidant-antioxidant balance in rats with acute hypoxia model / A.A. Kravtsov, S.V. Kozin, E.R. Vasilevskaya, A.A. Elkina, **L.V. Fedulova**, K.A. Popov, A.V. Moiseev, V.V. Malyshko, D.I. Shashkov, M.G. Baryshev // Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. – 2018. – Vol. 8. – № 2. P. 42 – 51. doi:10.6000 / 1927-5951.2018.08.02.3 (Scopus: Q3, SJR 2019=0,15)

13. Dzhimak, S. S. Changes in the functional activity of mitochondria isolated from the liver of rat that passed the preadaptation to ultra-low deuterium concentration / S.S. Dzhimak, A.A. Basov, N.N. Volchenko, A.A. Samkov, **L.V. Fedulova**, M.G. Baryshev // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 476. – P. 323 – 325. doi:10.1134/S1607672917050088 (Web of science; Scopus: Q3, SJR 2019=0,28)

14. Dzhimak, S.S. Some systemic effects of deuterium depletedwater on presenile female rats / S.S. Dzhimak, A.I. Shikhliarova, G.V. Zhukova, A.A. Basov, O.I. Kit, **L.V. Fedulova**, T.A. Kurkina, E.A. Shirnina, T.P. Protasova, M.G. Baryshev, A.A. Timakov // Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. – 2018. – Vol. 13. № 3. – e83494. doi:10.5812/jjnpp.83494 (Scopus: Q2, SJR 2019=0,23)

15. Лисицын, А.Б. Изучение влияния мясных полуфабрикатов, изготовленных с добавлением воды с пониженным содержанием дейтерия, на показатели лабораторных животных с моделью аллоксанового диабета / А.Б. Лисицын, А.Н. Богатырев, А.С. Дыдыкин, О.К. Деревицкая, Н.Е. Солдатова, **Л.В. Федулова** // Вопросы питания. – 2017. – Т.86. – № 1. – С. 64 – 71. doi:10.24411/0042-8833-2017-00022. (Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

16. Чернуха, И.М. Изучение влияния воды с модифицированным изотопным (D/H) составом на репродуктивную функцию, формирование и развитие потомства крыс / И.М. Чернуха, **Л.В. Федулова**,

Е.А. Котенкова, Е.Р. Василевская, А.Б. Лисицын // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 5. – С. 50 – 57. (Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

17. Богатырев, А.Н. Оценка эффективности использования йодсодержащих добавок в мясных кулинарных изделиях для детского питания / А.Н. Богатырев, А.С. Дыдыкин, М.А. Асланова, **Л.В. Федулова**, А.В. Устинова // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – № 4. – С. 68 – 75. (Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

18. **Fedulova, L.V.** Influence of Deuterium Depleted Water on Rat Physiology: Reproductive Function, Forming and Posterity Development/ L.V. Fedulova, S.S. Dzhimak, E.A. Kotenkova, E.R. Vasilevsky, I.M. Chernukha // Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – Р. 55 – 60. doi:10.6000/1927-5951.2016.06.02.3. (Scopus: Q3, SJR 2019=0,15)

19. Басов, А.А. Коррекция окислительного метаболизма в крови и тканях внутренних органов у лабораторных животных с помощью реакций изотопного D/H обмена / А.А. Басов, И.М. Быков, **Л.В. Федулова**, С.С. Джимак, М.Г. Барышев // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2016 – Т. 11. – № 1. – С. 103 – 107. doi:10.14300/mnnc.2016.11010 (Scopus: Q3, SJR=0,19)

20. Джимак, С.С. Коррекция метаболических процессов у крыс при хроническом эндотоксикозе с помощью реакций изотопного (D/H) обмена / С.С. Джимак, А.А. Басов, **Л.В. Федулова**, А.С. Дыдыкин, И.М. Быков, О.М. Лясота, Г.Н. Наумов, М.Г. Барышев // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2015. – № 5. – С. 518 – 527. doi:10.1134/S1062359015050064 (Web of Science)

21. Chernukha, I.M. Meat By-product is a Source of Tissue-specific Bioactive Proteins and Peptides Against Cardio-vascular Diseases/ I.M. Chernukha, **L.V. Fedulova**, E.A. Kotenkova // Procedia Food Science. – 2015. – V.5. – P.50 – 53. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.013 (Web of Science)

22. Лисицын, А.Б. Воздействие воды со сниженным содержанием дейтерия на организм лабораторных животных при различном функциональном состоянии неспецифических защитных систем / А.Б. Лисицын, М.Г. Барышев, А.А. Басов, Е.В. Барышева, И.М. Быков, А.С. Дыдыкин, Е.Е. Текущая, А.А. Тимаков, **Л.В. Федулова**, И.М. Чернуха, С.С. Джимак // Биофизика. – 2014. – Т. 59. – № 4. – С. 757 – 765. DOI: 10.1134/s0006350914040186 (Scopus: Q4, SJR=0,23)

23. Чернуха, И.М. Влияние полипептидов, выделенных из сычуга крупного рогатого скота, на регенераторные процессы желудка крыс / И.М. Чернуха, А.Н. Богатырев, А.С. Дыдыкин, М.А. Асланова, **Л.В. Федулова** // Вопросы питания. – 2014. – Т. 83. – № 5. – С. 26 – 32. (Scopus: Q3, SJR 2019=0,23)

### **Статьи в журналах, рекомендованных ВАК**

1. Бабурина М.И. Изучение эффективности использования кормовой добавки на основе побочных сырьевых ресурсов животного и растительного происхождения в кормовом рационе лабораторных животных / М.И. Бабурина, **Л.В. Федулова**, А.Н. Иванкин, Н.А. Горбунова // Все о мясе. – 2020. – № 5S. – С. 49-52.

2. Vasilevskaya E.R. Study of the functional product's protein compounds digestion features / E.R. Vasilevskaya, A.G. Akhremko, E.K. Polishchuk, **L.V. Fedulova** // Theory and Practice of Meat Processing. – 2020. – Т. 5. – № 3. – С. 18-21.

3. Ахремко А.Г. Применение протеомных технологий для изучения тимуса, селезенки и мезентеральных лимфатических узлов свиней / А.Г. Ахремко, **Л.В. Федулова**, Е.Р. Василевская // Все о мясе. – 2019. – № 1. – С. 54 – 57.

4. Зобкова З.С. Применение трансглутаминазы для повышения биологической ценности творога / З.С. Зобкова, Т.П. Фурсова, Д.В. Зенина, **Л.В. Федулова** // Пищевая промышленность. – 2017. – № 8. – С. 16 – 19.

5. Мосолова, Н.И. Высокоэффективные подходы к реализации молекулярно-генетических методов и повышению уровня биоконверсии кормов в производстве социально значимой продукции животноводства / Н.И. Мосолова, Е.Ю. Злобина, С.М. Иванов, Н.С. Пряничникова, **Л.В. Федулова** // Вестник российской сельскохозяйственной науки. – 2017. – № 3. – С. 4 – 6.

6. Стефанова И.Л. Исследование биологической ценности коагулированного зерненого яичного белка / И.Л. Стефанова, А.Ю. Клименкова, **Л.В. Федулова** // Птица и птицепродукты. – 2017. – № 4. – С. 65 – 67.
7. Василевская Е.Р. Тканеспецифичные биомолекулы -стимуляторы репаративной регенерации иммунных компонентов крови / Е.Р. Василевская, **Л.В. Федулова** // Гены и Клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 56.
8. Лисицын, А.Б. Законодательные основы и научные принципы создания функциональных пищевых продуктов на мясной основе / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, О.И. Лунина, **Л.В. Федулова** // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2016. – № 12 (146). – С. 151 – 158.
9. Зобкова, З.С. Медико-биологическая оценка творога с трансглутаминазой / З.С. Зобкова, Д.В. Зенина, Т.П. Фурсова, А.Д. Гаврилина, И.Р. Шелагинова, **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова // Молочная промышленность. – 2016. – № 10. – С. 60 – 63.
10. **Федулова, Л.В.** Исследования *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*: оценка заявленных свойств и изучение токсичности как неотъемлемые этапы создания продуктов здорового питания / **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова, Е.Р. Василевская, Э.Б. Арашанова // Все о мясе. – 2015. – № 6. – С. 32.
11. Чернуха, И.М. Биотрансформация побочного мясного сырья как инновационный подход к созданию протеомно–пептидных средств направленного действия / И.М. Чернуха, Л.А. Люблинская, **Л.В. Федулова**, Е.Р. Василевская, Е.А. Котенкова, А.Н. Макаренко // Все о мясе. – № 2. – С.14–17.
12. **Федулова, Л.В.** Безопасные и полезные продукты как главный фактор, определяющий качество жизни / **Л.В. Федулова**, И.М. Чернуха, А.С. Дыдыкин // Все о мясе. – 2014. – № 2. – С. 20–22.
13. Устинова, А.В. Колбасные изделия, обогащенные йодом, для детского питания / А.В. Устинова, А.С. Дыдыкин, **Л.В. Федулова** // Пищевая промышленность. – № 12.– 2013. – С. 20 – 22.
14. Чернуха, И.М. Применение функциональных мясных продуктов –инновационный подход к профилактике и лечению сердечно–сосудистых заболеваний / И.М. Чернуха, **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 6. – 2013. – С. 70 – 72.
15. Чернуха, И.М. Изучение природы действующего вещества препарата «Колимак» / И.М. Чернуха, Л.А. Люблинская, **Л.В. Федулова**, А.Н. Макаренко, Е.А. Тимохина // Все о мясе.– № 4. – 2013. – С.14 – 18.
16. Дыдыкин, А.С. Перспективы применения йодсодержащих добавок в мясных продуктах детского питания / А.С. Дыдыкин, А.В. Устинова, **Л.В. Федулова**, Н.Л. Вострикова // Все о мясе – № 4. – 2013. –С. 28–32.
17. Лисицын, А.Б. Ткани сердца и аорты крупного рогатого скота и свиней как функциональный мясной ингредиент с заданным белково-пептидным профилем / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова, С.С. Шишкун // Все о мясе. – № 5. – 2013. – С. 48 –51.
18. Дыдыкин, А.С. Йодсодержащие препараты в мясных продуктах детского питания / А.С. Дыдыкин, **Л.В. Федулова**, В.Н. Щипцов, А.П. Попова, А.В. Устинова, Д.Е. Лукин // Мясная индустрия. – 2012. – № 12. – С. 14 – 17.
19. Чернуха, И.М. Разработка ферментно–тканевого препарата для лечения желудочно–кишечных расстройств на основе экстрактов тканей желудка, двенадцатиперстной кишки и поджелудочной железы свиней / И.М. Чернуха, Б.В. Уша, А.Н. Макаренко, **Л.В. Федулова**, Т.С. Елизарова, Э.Б. Арашанова // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 4. – С.12 – 14.
20. Попова, А.П. Медико-биологическая оценка специализированных паштетов для питания юных спортсменов / А.П. Попова, А.В. Устинова, **Л.В. Федулова** // Мясная индустрия. – 2012. – № 4. – С. 52 – 54.

### **Материалы симпозиумов, конгрессов, конференций**

21. Басов А.А. Особенности гендерного влияния на функциональную активность иммунной системы тканеспецифичных биомолекул *sus scrofa* при циклофосфамид-индуцированном

иммунодефиците у крыс / А.А. Басов, Л.В. Федулова, Е.Р. Василевская // Сборник: Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. материалы Международной конференции NT + M&Ec'2019. Весенняя сессия. – 2019. – С. 227 – 231.

22. Котенкова, Е.А. Влияние биологически активных веществ животного происхождения, выделенных из тканей SusScrofa, на состояние сердечно-сосудистой системы крыс с моделью гиперлипидемии / Е.А. Котенкова, **Л.В. Федулова**, И.Ф. Горлов, Н.И. Мосолова // Сборники конференций НИЦ Социосфера. –2016. – № 56. – С. 396 – 400.

23. **Федулова Л.В.** Сравнительный анализ пептидного профиля экстрактов животного происхождения на основе воды с низким содержанием дейтерия /**Л.В. Федулова**, Е.Р. Василевская // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2015. – № 1. – С. 487 – 492.

24. **Федулова Л.В.** Исследование антиульцерогенного действия обогащенного мясного продукта *in vivo* / **Л.В. Федулова**, А.А. Сорокина // Сборник научных трудов IX Международной конференции молодых ученых и специалистов «Повышение качества, безопасности и конкурентоспособности продукции агропромышленного комплекса в современных условиях», ФГБНУ ВНИИПБиВП, Москва. – 2015. – С. 321 – 325.

25. **Fedulova L.V.** Anti-inflammatory activity of porcine and bovine cardiac and aortic tissues/**L.V. Fedulova**, I.M. Chernukha, E.A. Kotenkova, A.B. Lisitsyn // 61 ICoMST Proceedings. France. – 2015. – P.253

26. **Fedulova L.V.** Development and studying of the meat product with prophylactic action under cerebrovascular diseases / **L.V. Fedulova**, O.N.Makarenko // Наукові розробки, передові технології, інновації (Збірник наукових праць з наукових дій з Матеріалами II Міжнародної науково-практичної конференції). Будапешт-Прага-Київ. - К.: НДІЕР. – 2015. – С. 213 – 214.

27. **Федулова Л.В.** Лечебно-профилактическое средство «Динормин»/ **Л.В. Федулова**, Е.Р.Василевская // Тезисы докладов X Международной научно-технической конференции «Техника и технология пищевых производств», «Могилевский государственный университет продовольствия», Беларусь. – 23 – 24 апреля 2015. – С.159.

28. **Федулова, Л.В.** Функциональные мясные продукты питания как важный аспект укрепления здоровья и продления жизни /**Л.В. Федулова**, Котенкова Е.А. // Сборник трудов научно-практической конференции молодых учёных, посвященной 80-летию со дня рождения академика РАМН, заслуженного деятеля науки РВ А. И. Потапова «Современные подходы к обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения России» Под редакцией В.Н. Ракитского. Москва. – 2015.– С. 256 – 261.

29. **Федулова Л.В.** Влияние овощных культур на состояние биологических объектов /**Л.В. Федулова**, Е.И. Добриян, Г.А. Донская // Пищевые инновации и биотехнологии Материалы Международной научной конференции. ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности». – 2015.– С. 64 – 66.

30. **Федулова Л.В.** Разработка лечебно-профилактического средства «Динормин», обладающего иммунокоррекирующими свойствами /**Л.В. Федулова**, Е.Р. Василевская // Сборник научных трудов VIII Международной конференции молодых ученых и специалистов «Фундаментальные и прикладные исследования по безопасности и качеству пищевых продуктов», г. Видное, 4 – 5 декабря 2014, ФГБНУ «ВНИИТеК», с. 41 – 44.

31. **Федулова Л.В.** Изучение молекулярно-биологических основ гиполипидемической и противовоспалительной активности функциональных ингредиентов с целью создания на их основе продуктов питания направленного биокорректирующего действия/ **Л.В. Федулова**, И.М. Чернуха, Е.А. Котенкова // Международная научно - практическая конференция «Актуальные проблемы и современные технологии производства продуктов питания» – Кутаиси, Грузия. – 12 –13 июня 2014 г.

32. **Fedulova L.V.** Hypolipidemic and anti-inflammatory effect of cattle and pig heart and aorta tissues/**L.V. Fedulova**, I.M. Chernukha, E.A. Kotenkova // 60th International congress of meat science and technology, August, 17th – 22<sup>nd</sup>. 2014 PuntadelEste. Uruguay.

**Патенты и заявки на выдачу патентов РФ**

33. Патент № 2524127 Российская Федерация, МПК G09B23/28. Способ моделирования атеросклероза / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова. № 2013121753/14. Заявлено 14.05.2013; Опубл. 27.07.2014.

34. Патент № 2550649 Российская Федерация, МПК A23B 4/005. Функциональный мясной продукт и способ его получения / А.Б. Лисицын, И.М. Чернуха, **Л.В. Федулова**, Е.А. Котенкова. № 2013121753/14. Заявлено 05.06.2013; Опубл. 10.05.2015.